

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KHIOMARA KHÉMELI DELLANI DE LIMA

OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DO AROMA DE BAUNILHA ATRAVÉS DO  
CULTIVO *IN VITRO* DE *Vanilla planifolia*

CURITIBA

2016

KHIOMARA KHÉMELI DELLANI DE LIMA

OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DO AROMA DE BAUNILHA ATRAVÉS DO  
CULTIVO *IN VITRO* DE *Vanilla planifolia*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriane Bianchi Pedroni Medeiros

Coorientador: Prof. Dr. André Luís Lopes da Silva

CURITIBA

2016

Catálogo na Fonte: Sistema de Bibliotecas, UFPR  
Biblioteca de Ciência e Tecnologia

L732o

Lima, Khiomara Khémeli Dellani de

Obtenção de compostos do aroma de baunilha através do cultivo in vitro de *Vanilla planifolia* [recurso eletrônico] / Khiomara Khémeli Dellani de Lima. – Curitiba, 2016.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2016.

Orientadora: Adriane Bianchi Pedroni Medeiros.

Coorientador: André Luís Lopes da Silva.

1. Fenóis. 2. Aromas. 3. Baunilha. 4. Plantas aromáticas. 5. Celulas vegetais - Cultura e meios de cultura. I. Universidade Federal do Paraná. II. Medeiros, Adriane Bianchi Pedroni. III. Silva, André Luís Lopes da. IV. Título.

CDD: 631.535

Bibliotecária: Vanusa Maciel CRB- 9/1928



Ministério da Educação e do Desporto  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Tecnologia  
Programa de Pós Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

## TERMO DE APROVAÇÃO

Khiomara Khémeli Dellani de Lima

### “OBTENÇÃO DE COMPOSTOS DO AROMA DE BAUNILHA ATRAVÉS DO CULTIVO IN VITRO DE *Vanilla Planifolia*”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

Curitiba, 17 de Junho de 2016.

Prof.ª Dr.ª. Adriane Bianchi Pedroni Medeiros

Dr.º André Luis Lopes da Silva

Prof.ª Dr.ª. Cristine Rodrigues

Dr.ª. Valcineide Oliveira de Andrade Tanobe

## **AGRADECIMENTOS**

À professora Adriane pela orientação, apoio e pela imensa oportunidade de aprendizagem e crescimento.

Ao professor André pelo co-orientação, apoio e auxílio em todos os momentos.

A todos os professores deste departamento pelo auxílio na minha formação.

À minha família por todo o carinho, compreensão e suporte emocional.

A todos os colegas de laboratório que colaboram com a pesquisa, discussões e alegrias durante o desenvolvimento das atividades.

Aos técnicos de laboratório Mitiyo, Natascha, Otacílio e Marisa sempre atenciosos e dispostos a ajudar.

Aos estagiários e a Camila aluna de iniciação científica pela dedicação na realização de experimentos.

À professora Cristine pelas análises em HPLC.

Ao professor Luiz Antonio Biase pela ajuda e disponibilidade do Laboratório de Micropropagação e casa de vegetação (Setor de Ciências Agrárias).

A CAPES pelo suporte financeiro.

A UFPR e ao programa de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia pela oportunidade de estudo e estrutura necessária para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O aroma de baunilha é um dos aromas mais apreciados e utilizados na indústria alimentícia, farmacêutica e de perfumaria. A baunilha natural é obtida através de um laborioso processo de maturação da vagem da orquídea gênero *Vanilla*, sendo a espécie *Vanilla planifolia* a que possui a melhor composição aromática. Neste trabalho, foi estudada a produção de vanilina e compostos fenólicos presentes na planta *in vitro*. Explantes de *Vanilla planifolia* foram cultivados em meio de cultivo MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Este meio foi utilizado em experimentos para o enraizamento e alongamento dos explantes, que depois foram aclimatizados. Testou-se a suplementação do meio com elicitores e precursores, como ácido ferúlico, fenilalanina, vitaminas Fuji e cisteína. A extração do material vegetal com 5, 10, 20 e 30 dias de cultivo, foi realizada em Soxhlet utilizando etanol como solvente. Os extratos foram analisados em HPLC e foi detectada a presença de ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, ácido ferúlico, vanilina e outros compostos não identificados. Estes compostos foram encontrados em diversas concentrações em todos os tratamentos avaliados. No caso da produção de vanilina, os melhores resultados foram obtidos com a adição de cisteína e carvão ativado, na concentração de 26,4 mg.g<sup>-1</sup> de massa fresca.

Palavras-chave: Organogênese. Compostos fenólicos. Vanilina. Aroma.

## ABSTRACT

Vanilla is one of the most appreciated flavor used in food, pharmaceutical and perfumery industries. The natural vanilla is obtained by a laborious maturation process from the pods of orchid *Vanilla*. *Vanilla planifolia* species has the best flavor composition. In this work, it was studied the plant production of vanillin and phenolic compounds *in vitro*. Explants of *Vanilla planifolia* were cultivated on MS medium supplemented with 35 mg.L<sup>-1</sup> cysteine, 2 g.L<sup>-1</sup> activated charcoal, 2.15 mg.L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP), 30 g.L<sup>-1</sup> sucrose and solidified with 2.2 g.L<sup>-1</sup> Phytigel®. This culture medium was used to elongate and root the explants. These explants (complete plants) were suitable acclimatized. Supplementation of elicitors and precursors such as ferulic acid, phenylalanine, Fuji vitamins and cystein was also tested using the same culture medium. The fresh material with 5, 10, 20 and 30 days was extracted in Soxhlet using ethanol as solvent. The presence of vanillin, ferulic acid, 4-hydroxybenzaldehyde and vanillic acid was detected by HPLC analysis, other unidentified compounds were also detected. These compounds have been found at different concentrations in all treatments. In the case of vanillin production, the best results were obtained with the addition of activated carbon and cysteine, at a concentration of 26,4 mg.g<sup>-1</sup> of fresh mass.

Keywords: Organogenesis. Phenolic compounds. Vanillin. Flavor.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	12
2.1 OBJETIVO GERAL	12
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b>	13
3.1 CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DA VANILINA	13
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE	13
3.3 CULTIVO, FLORAÇÃO, POLINIZAÇÃO E OBTENÇÃO DA VAGEM.....	13
3.4 PROCESSO DE BENEFICIAMENTO E CURA DA VAGEM.....	14
3.5 COMPOSIÇÃO DA VAGEM.....	15
3.6 CULTIVO <i>IN VITRO</i>	15
3.7 OXIDAÇÃO NOS EXPLANTES.....	17
3.8 CULTURA DE CÉLULAS	18
3.9 ROTA BIOSSINTÉTICA DA VANILINA EM <i>Vanilla planifolia</i>	19
3.10 ELICITORES.....	21
3.11 PRECURSORES	21
3.12 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO.....	22
3.13 DETERMINAÇÃO DE VANILINA E COMPOSTOS RELACIONADOS ....	22
<b>4. MATERIAL E METODOS</b>	24
4.1 ESTABELECIMENTO DA CULTURA <i>IN VITRO</i>	25
4.2 MEIO DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> UTILIZADO PARA <i>Vanilla planifolia</i> .....	25
4.3 PREPARO DE MEIO DE CULTURA MS.....	26
4.4 CONDIÇÕES GERAIS DE CULTURA <i>IN VITRO</i>	26
4.5 MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO DE EXPLANTES <i>IN VITRO</i> .....	27
4.6 MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PROTUBERÂNCIAS	28
4.7 CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS LÍQUIDO	28
4.8 INDUÇÃO DE CALOS.....	29
4.9 INDUÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS.....	29
4.10 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS .....	30
4.11 SUSPENSÃO CELULAR VEGETAL DE <i>Vanilla planifolia</i> .....	30
4.12 MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Vanilla planifolia</i> COM ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	30



<b>4.13</b>	SELEÇÃO DE MEIOS DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> PARA <i>Vanilla planifolia</i> .....	31
<b>4.14</b>	INFLUÊNCIA DO ÁGAR E PHYTAGEL® NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Vanilla planifolia</i> .....	32
<b>4.15</b>	INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE VITAMINAS FUJI NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Vanilla planifolia</i> .....	33
<b>4.16</b>	ACLIMATIZAÇÃO .....	33
<b>4.17</b>	ADIÇÃO DE ELICITORES E PRECURSORES.....	34
<b>4.18</b>	TEOR DE FENÓIS TOTAIS .....	35
<b>4.19</b>	DETERMINAÇÃO DE MASSA FRESCA E MASSA SECA .....	36
<b>4.20</b>	EXTRAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO, P-HIDROXIBENZALDEÍDO, VANILINA E ÁCIDO FERÚLICO .....	37
<b>4.21</b>	IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO, P-HIDROXIBENZALDEÍDO, VANILINA E ÁCIDO FERÚLICO.....	37
<b>4.22</b>	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
<b>5.1</b>	MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO DE EXPLANTES <i>IN VITRO</i> .....	39
<b>5.2</b>	MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE PROTUBERÂNCIAS .....	41
<b>5.3</b>	CULTIVO <i>IN VITRO</i> EM MEIO MS LÍQUIDO .....	42
<b>5.4</b>	INDUÇÃO DE CALOS.....	43
<b>5.5</b>	INDUÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS .....	43
<b>5.6</b>	CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS.....	45
<b>5.7</b>	SUSPENSÃO CELULAR VEGETAL DE <i>Vanilla planifolia</i> .....	47
<b>5.8</b>	MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Vanilla planifolia</i> COM ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES E CONDIÇÕES DE CULTIVO .....	47
<b>5.9</b>	SELEÇÃO DE MEIOS DE MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> PARA <i>Vanilla planifolia</i> .....	49
<b>5.10</b>	INFLUÊNCIA DO ÁGAR E PHYTAGEL® NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Vanilla planifolia</i> .....	54
<b>5.11</b>	INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE VITAMINAS FUJI NA MULTIPLICAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>Vanilla planifolia</i> .....	58
<b>5.12</b>	ACLIMATIZAÇÃO .....	60
<b>5.13</b>	TEOR DE FENÓIS TOTAIS .....	62
<b>5.14</b>	DETERMINAÇÃO DE MASSA FRESCA E MASSA SECA .....	64

<b>5.15 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO, P-HIDROXIBENZALDEÍDO, VANILINA E ÁCIDO FERÚLICO.....</b>	<b>66</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>7. PERSPECTIVAS PARA PESQUISAS FUTURAS .....</b>	<b>74</b>
<b>8. APÊNDICE.....</b>	<b>75</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A vanilina é um aldeído aromático, conhecida como o aroma de baunilha, obtido tradicionalmente da vagem de uma orquídea tropical, à *Vanilla planifolia*, que produz as melhores notas aromáticas. O cultivo tradicional produz pequena quantidade de vanilina cerca de 2 a 3% do peso da vagem e apresenta um custo elevado de produção e beneficiamento. Pois a vanilina é obtida através da cura da vagem, processo longo e laborioso de maturação que otimiza o desenvolvimento do aroma, proporcionando sabores e aromas únicos.

Está orquídea é muito sensível a doenças e pragas, pois há pouca variação genética nas regiões produtoras, além disso a *Vanilla* exige condições especiais de solo e clima, para seu bom desenvolvimento. A propagação é feita por estacas e seu crescimento é lento, a polinização ocorre manualmente e a formação da vagem demora meses, sendo bastante custosa à manutenção da cultura.

A vanilina é extremamente apreciada e amplamente utilizada, na produção de alimentos como doces, refrigerantes e sorvetes, devido o seu alto consumo e a baixa produção natural de vanilina, a vanilina sintética tornou-se uma alternativa muito utilizada na indústria por possuir baixo custo e alta produtividade, mas a produção de vanilina por via sintética não apresenta as mesmas notas aromáticas, que as produzidas pela cura das vagens de *Vanilla*, que é composto por mais de 250 compostos aromáticas que contribuem para a sua alta qualidade organoléptica (DAUGSCH & PASTORE, 2005; LONGO *et al.*, 2006).

A busca por aromatizantes naturais tem crescido nos últimos anos e para suprir a demanda, tem-se investido em pesquisas, para desenvolver métodos biotecnológicos para a produção da vanilina. Esta pode ser obtida de maneira natural através de cultivo *in vitro*, com a vantagem de produzir explantes livres de doenças, também por cultura de células vegetais imobilizadas ou em suspensão e pela conversão de precursores e elicitores, que podem ser produzidas em um curto período de tempo, além de ter a

possibilidade de formação de outros compostos aromáticos que compõem o aroma natural de baunilha (BERGER, 2000).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo geral a obtenção de vanilina através do cultivo *in vitro* de *Vanilla planifolia*.

Os objetivos específicos do trabalho visaram:

- Selecionar um meio adequado para a multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia*;
- Diminuir a ocorrência de oxidação nos explantes para maximizar a sua propagação *in vitro*;
- Indução de calos para obtenção de suspensão celular;
- Extrair e quantificar os compostos de explantes cultivados *in vitro*;
- Investigar a adição de precursores e elicitores no meio de cultivo vegetal para a produção de vanilina.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO E IMPORTÂNCIA DA VANILINA

A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é a principal nota sensorial do aroma natural da baunilha, que é composta por uma complexa combinação, de mais 250 substâncias voláteis presentes na vagem da orquídea *Vanilla* (VALDEZ-FLORES & CAÑIZARES-MACIAS, 2007).

A vanilina é uma das especiarias mais consumida no mundo, sendo utilizada na indústria de alimentos, bebidas, fármacos, cosméticos, perfumaria, dentre outras. Em 2012 foram produzidas 9,8 toneladas de vagens de baunilha no mundo (FAO, 2012), Madagascar é responsável por 80 % desta produção. No Brasil, o principal produtor é o estado da Bahia, mas a produção brasileira ainda é reduzida e depende da importação para suprir a demanda nacional. Em 2013 foram importados 290 kg de baunilha ao preço de 53 US\$/kg, o preço apresenta grande instabilidade em cada safra, em decorrência das oscilações na produtividade (BRASIL, 2014). A vanilina natural extraída da vagem pode custar mais de mil US\$/kg, pois o processo de produção e beneficiamento possui alto custo (DAUGSCH & PASTORE, 2005; MEDINA *et al.*, 2009).

#### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DA ESPÉCIE

*Vanilla planifolia* é uma orquídea nativa do México e da América Central (FUNK & BRODELIUS, 1990), pertencente à família *Orchidaceae* e o gênero *Vanilla* consiste de aproximadamente 200 espécies (BORY *et al.*, 2008), muitas espécies desse gênero são produtoras de aroma, entretanto, as mais conhecidas são a *V. pompona*, *V. tahitiensis*, *V. java*, *V. trigonocarpa* e a *V. planifolia* (MABBERLEY, 1997). *V. planifolia* é a principal produtora de vanilina por apresentar melhor aroma e sabor (RANADIVE, 1994), considerando que o extrato bruto é comercializado e este apresenta um perfil complexo envolvendo outras moléculas aromáticas.

#### 3.3 CULTIVO, FLORAÇÃO, POLINIZAÇÃO E OBTENÇÃO DA VAGEM

No campo é propagada a partir de estacas da planta matriz, porém esse tipo de propagação causa a interrupção do crescimento e desenvolvimento da espécie (AYYAPPAAN, 1990). Esta técnica tradicional é bastante lenta e trabalhosa (MEDINA *et al.*, 2009; KALIMUTHU *et al.*, 2006), apresentando reduzidas taxas de multiplicação nesta espécie (LEE-ESPINOSA *et al.*, 2008). As orquídeas são muito sensíveis a doenças, as principais são causadas por *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora meadii*, *Calospora vanillae*, *Sclerotium*, *Anthracnose (Colletotrichum vanillae)* e *Puccinia sinamononea*, que afetam de maneira considerável a multiplicação por estacas no cultivo tradicional (MEDINA *et al.*, 2009; MINOO, 2002).

Depois do plantio a primeira floração só ocorrerá após 2 ou 3 anos, necessitando de 30 dias de sol para que a floração ocorra. A polinização das flores é feita manualmente, pois a sua massa polínica é muito densa para ser dispersa pelo vento e o órgão feminino é pouco exposto, dificultando a polinização por insetos. As vagens demoram de 8 a 9 meses para serem formadas e são colhidas ainda verdes (HOMMA & MENEZES, 2014).

### 3.4 PROCESSO DE BENEFICIAMENTO E CURA DA VAGEM

As vagens passam por um processo de beneficiamento e secagem que levam cerca de seis meses, chamado de cura, (Figura 1) só após esta etapa a vagem vai desenvolver o aroma e sabor característico. Existem vários tipos de cura, cada cultivar de baunilha e cada região produtora, desenvolveu seu próprio processo de cura, mas geralmente consiste em cinco etapas: escalda, banho de sol/transpiração, secagem, classificação e condicionamento (DIGNUM *et al.*, 2001).

A escalda ocorre com água quente para interromper a maturação e inibir a proliferação de leveduras e fungos, que prejudicam o processo enzimático de maturação e fermentação, além de diminuir a qualidade do aroma e o preço da vagem. O banho de sol intercalado com a transpiração é essencial para a maturação. A secagem não menos importante, deve ser realizada até atingir 20 % de umidade (HOMMA & MENEZES, 2014).

As vagens passam por duas alterações significativas, a primeira é a desidratação pelo processo de secagem, o segundo são as alterações que

envolvem a transformação química, que é geralmente acompanhada por alterações hidrolíticas e oxidativas com ou sem o auxílio de enzimas. As principais enzimas envolvidas no processo são  $\beta$ -glicosidase, peroxidase, protease e fenilalanina amônialiase (DIGNUM *et al.*, 2002).

A vanilina está presente na vagem verde em pequenas quantidades, porém o aumento da concentração só ocorre depois do processo de cura pela ação da enzima  $\beta$ -glicosidase no glicosídeo glicovanilina (MEDINA *et al.*, 2009).

Depois do processo de cura a vagem perde 75 % da massa inicial, aproximadamente 300 vagens frescas equivalem a 1 kg de vagem seca (HOMMA & MENEZES, 2014). Além disso, apenas 2 % da massa da vagem seca correspondem ao composto vanilina (MEDINA *et al.*, 2009; DAUGSCH & PASTORE, 2005). Esta porcentagem de vanilina vai aumentando ano após ano, mas a concentração máxima só é atingida após 3 ou 4 anos de floração, depois irá diminuir a produção do composto gradativamente ao fim do período reprodutivo da planta (MEDINA *et al.*, 2009).

Figura 1: A- Vagens em processo de desenvolvimento. B- Vagens curadas.



Fonte: HOMMA & MENEZES, 2014.

### 3.5 COMPOSIÇÃO DA VAGEM

A composição química da vagem curada, pode variar muito, de acordo com RANADIVE (1994) e RAO & RAVISHANKAR (2000a), os compostos encontrados em maior quantidade são vanilina, ácido vanílico, ácido p-hidroxibenzóico, p-hidroxibenzaldeído, proteínas, açúcares, celulose, hemicelulose, lipídios, resinas, pigmentos, taninos, minerais e óleos essenciais.

### 3.6 CULTIVO *IN VITRO*



Há uma demanda crescente pelo aroma natural de baunilha no comércio global, que poderá ser suprida pelo estabelecimento de protocolos de propagação mais eficientes, tanto *ex vitro* como *in vitro* (RAO & RAVISHANKAR 2000b).

A cultura de tecidos vegetais é a única metodologia que pode produzir uma enorme quantidade de linhagens clonais em um curto período de tempo com alta qualidade fitossanitária (SILVA *et al.*, 2014). Além disso, a cultura de tecidos vegetais é uma importante ferramenta que permite a produção de metabólitos primários e secundários em condições ambientais controladas, independente das condições climáticas, sendo que diversas abordagens para a produção de metabólitos envolvem a cultura de calos, suspensão celular, raiz de cabeleira (i.e. explantes transformados com genes indutores de raízes oriundos de *Agrobacterium rhizogenes*) e brotações múltiplas (COSTA *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, a técnica de cultura de tecidos tem demonstrado mais vantagens na propagação de *Vanilla planifolia*, em comparação com o método convencional. Como conservar recursos genéticos de espécies selvagens, satisfazer a demanda do mercado por propágulos (GEORGE & RAVISHANKAR, 1997; GEETHA & SUDHEER, 2000; GIRIDHAR *et al.*, 2001; LEE-ESPINOSA *et al.*, 2008), produzir plantas elite livres de doenças (GONZALEZ-ARNAO *et al.*, 2009). Contudo, muitos protocolos (Tabela 1) foram desenvolvidos com foco na multiplicação de explantes de *Vanilla planifolia*, a partir de diferentes tipos de explantes iniciais e utilizando diferentes tipos de substâncias e fitoreguladores de crescimento. Giridhar *et al.*, (2001), estudou a influência do nitrato de prata na multiplicação e enraizamento. Tan *et al.*, (2011) adicionou nitroprussiato de sódio e BAP (6-benzilaminopurina), com o qual obteve 10,3 brotos por explante após 60 dias de cultivo, sendo que 93% dos explantes iniciais formaram brotos.

Gopi *et al.*, (2006), utilizou os hormônios BAP e ANA (ácido naftaleno acético) e obteve 12,6 brotos por segmento nodal. Estes hormônios também foram utilizados por George & Ravishankar, (1997), os quais obtiveram 42 brotos a partir de uma gema axilar após 134 dias.

Tabela 1: Protocolos de multiplicação *in vitro* de *V. planifolia*

Protocolos de multiplicação <i>in vitro</i> de <i>V. planifolia</i>	
Explante inicial	Referências
Calos	GU <i>et al.</i> , 1987; DAVIDONIS & KNORR 1991; GEETHA & SHETTY, 2000; JANARTHANAM & SESHADRI, 2008; TAN <i>et al.</i> , 2010.
Protocórnios, ápices de raiz	PHILIP & NAINAR, 1986.
Segmentos nodais	GANESH <i>et al.</i> , 1996; GOPI <i>et al.</i> , 2006. GIRIDHAR <i>et al.</i> , 2001; ABEBE <i>et al.</i> , 2009; TAN <i>et al.</i> , 2011
Gemas auxiliares	GEORGE & RAVISHANKAR, 1997; GIRIDHAR & RAVISHANKAR, 2004; KONONOWICZ & JANICK, 1984; LEE-ESPINOSA, 2008.
Ápices caulinares	GEETHA & SHETTY, 2000
Brotos	RAO <i>et al.</i> , 1993; GIRIDHAR <i>et al.</i> , 2001; KALIMUTHU <i>et al.</i> , 2006.
Microestacas	GONZALEZ-ARNAO <i>et al.</i> , 2009.

Adição de mio-inositol, ácido cítrico e ácido ascórbico no meio de cultura, também mostraram bons resultados na formação de brotos, utilizando segmentos de microestacas contendo nós (i.e. segmentos nodais). Os segmentos usando do 1º até o 4º nó, resultaram na obtenção de 18 brotos por explante e os segmentos que apresentavam do 5º até 8º nó, resultaram na formação de 11 brotos por explante (LEE-ESPINOSA *et al.*, 2008). A adição de água de coco e BAP no meio de cultura, após 20 dias de cultivo, produziram 9,4 brotos por segmento nodal. (KALIMUTHU *et al.* 2006).

### 3.7 OXIDAÇÃO NOS EXPLANTES

Na micropropagação a ocorrência da oxidação nos explantes é uma dificuldade frequente que ainda não foi completamente superada, o processo de oxidação se inicia com a liberação de compostos fenólicos no meio de cultura, fato que causa dano as células, durante o corte dos tecidos vegetais, causando o escurecimento do explante e do meio de cultura, dificultando a regeneração resultando na morte dos tecidos (CID & TEIXEIRA, 2010). Os compostos fenólicos são metabólitos secundários, que auxiliam no desenvolvimento das plantas, e são liberados para proteger a planta em situações de estresse biótico ou abiótico.

Algumas alternativas são utilizadas para diminuir a ocorrência da oxidação, como, subcultivos frequentes, transferindo o explante para um meio de cultivo novo (SILVA *et al.*, 2015), uso de antioxidantes tais como ácido

cítrico, ácido ascórbico, cisteína e nitrato de prata (ABDELWAHD *et al.*, 2008; ARDITTI & ERNST, 1993; CID & TEIXEIRA, 2010), adição de adsorventes ao meio de cultura como o carvão ativado (ARDITTI & ERNST, 1993) e a polivinilpirrolidona (LAINÉ & DAVID, 1994; ABDELWAHD *et al.*, 2008), redução da intensidade luminosa ou escuro total no início da incubação dos explantes (FACHINELLO *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2015), uso de diferentes agentes de solidificação (GEORGE, 1996) e vedação dos frascos para permitir maiores trocas gasosas e evitar a concentração do etileno, o qual induz a senescência nos explantes (SILVA *et al.*, 2015).

### 3.8 CULTURA DE CÉLULAS

Um método alternativo de produção de aromas pode ser obtido via cultura de células em suspensão oriundas de calos friáveis cultivados *in vitro*. Afinal, os compostos sintéticos e/ou naturais podem ser produzidos ou biotransformados, considerando que algumas das reações que ocorrem nas células de plantas (i.e. metabolizadas), são muito complexas e dificilmente são reproduzidas por síntese química (DAUGSCH & PASTORE, 2005; FUNK & BRODELIUS, 1994). Os calos friáveis são biomassas celulares vegetais que não possuem integridade estrutural, devido a esta característica, as células são facilmente liberadas em meio de cultivo formando as suspensões celulares. Knuth & Sahai (1991), obtiveram calos friáveis a partir de *V. planifolia*, utilizando 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) e BAP na concentração 1ppm, após 20 dias de cultivo. Velankar & Heble (2004), também obtiveram calos friáveis após 20 dias utilizando BAP e ANA na concentração de 2 mg.L<sup>-1</sup>.

Culturas de células imobilizadas de *Capsidium frutescens*, demonstraram a capacidade de biotransformação do ácido ferúlico e vanililamina em vanilina e capsaicina (SUDHAKAR *et al.*, 1996). Suspensões celulares e células imobilizadas de *C. frutescens*, foram avaliadas utilizando como elicitador, o isoeugenol e um extrato de fungo de *Aspergillus niger* para produção de vanilina e capsaicina (RAO & RAVISHANKAR, 1999). Células de calos tratadas com 1 mM de ácido ferúlico aumentaram a concentração de vanilina em 1,7 vezes comparados com células não tratadas (ROMAGNOLI & KNORR, 1988).

A adição da resina XAD-4 no meio de cultura favoreceu o sabor da baunilha em suspensão celular de *V. fragans*, por ter absorvido com maior eficácia os compostos responsáveis pelo aroma da baunilha (KNUTH & SAHAI, 1991).

Apesar dessas poucas pesquisas, terem sido realizadas há algum tempo, cerca de 16 anos. Esses resultados sugerem que a suspensão celular de *Vanilla planifolia* pode não ser uma alternativa interessante, afinal, muitas pesquisas envolvendo outras técnicas têm sido exploradas, apresentando maior potencial de produção. A principal desvantagem dessa técnica é a dificuldade da recuperação dos compostos de aroma presentes no meio de cultura líquido.

Estudos mais recentes utilizaram a suspensão celular de *V. planifolia* para estudar a biossíntese do ácido vanílico, e encontraram uma indução máxima, com a concentração de 20 mg de cinetina por grama da massa fresca de células (RENUGA & KUMAR, 2014).

### 3.9 ROTA BIOSSINTÉTICA DA VANILINA EM *Vanilla planifolia*

A biossíntese da via metabólica da vanilina (Figura 2) tem sido extensivamente estudada, no entanto, a biossíntese da via continua sendo uma questão controversa (WALTON *et al.*, 2003; DIXON, 2011).

Funk & Brodelius, (1990) e Havkin-Frenkel & Belanger, (2010) sugeriram em seus estudos que a vanilina é um glicosídeo derivado da fenilalanina, que é intermediária da via do ácido chiquímico e dos precursores da lignina.

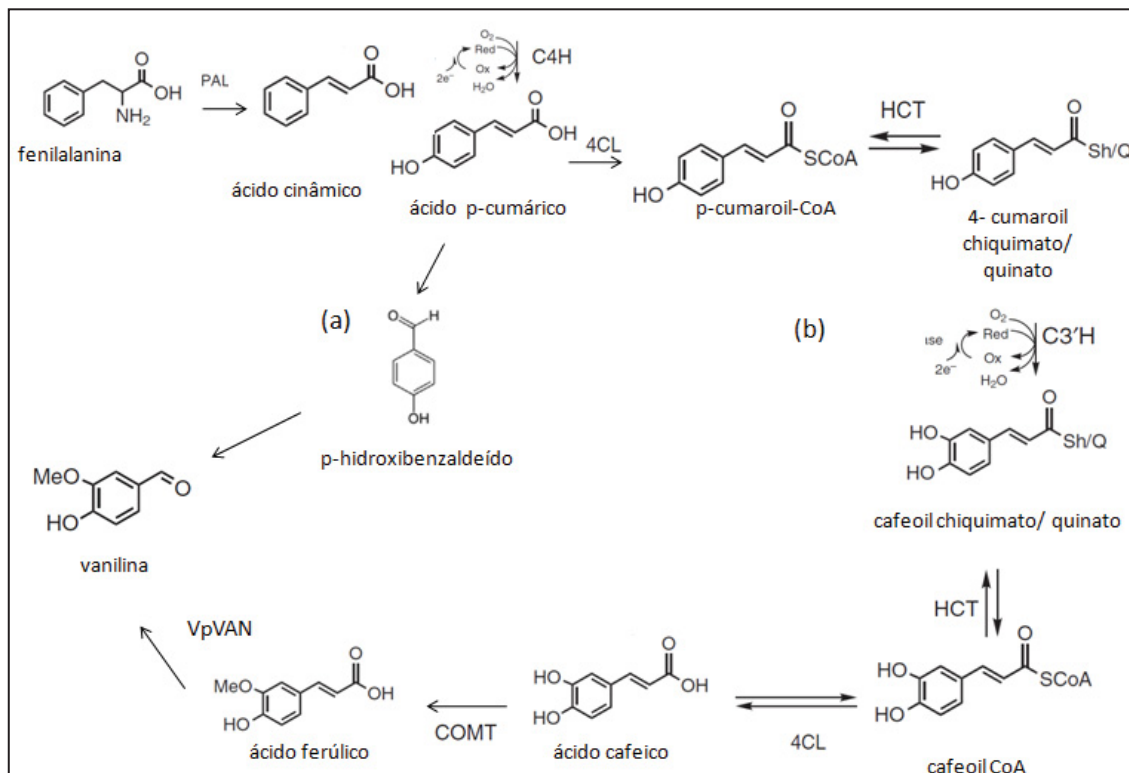
Podstolski *et al.*, (2002) relatam em seus estudos que o 4-hidroxibenzaldeído precursor da biossíntese da vanilina, é formado pela enzima não oxidativa 4-hidrobenzalaldeído sintase, que converte o ácido 4-cumárico para 4-hidroxibenzaldeído, na presença de um tiol, sem necessidade de um cofator.

Outros estudos sugeriram que a vanilina é formada a partir de L-fenilalanina por meio de precursores monoméricos da lignina: ácido cinâmico, ácido p-cumárico, ácido cafeico e ácido ferúlico, envolvendo fenilalanina amônia-liase (PAL), hidroxilações, uma metilação e uma reação de

encurtamento da cadeia. A formação do glicosídeo de vanilina também exigiria a participação de uma enzima glicosiltransferase (UGT) embora o ponto em que a glicosilação ocorre, permanece indefinido (DIXON *et al.*, 2002).

Figura 2: (a) Biossíntese de vanilina a partir do p-hidroxibenzaldeído (via resumida).

(b) Proposta de uma rota biossintética de vanilina em *V. planifolia*.



Fonte: GALLAGE & MØLLER, 2014 (adaptado).

Pak *et al.*, (2004) e Podstolski *et al.*, (2002), em seus estudos propõem duas vias para a biossíntese do ácido p-cumárico a glicovanilina. A primeira propõe uma via oxidativa com a formação de um éster de coenzima A, seguindo a via do ferulato, através da metilação e hidroxilação e conseqüente encurtamento de cadeia. A segunda hipótese propõe uma via não oxidativa com a cadeia de encurtamento na primeira fase, seguida por uma metilação e hidroxilação do anel aromático, através da via do benzoato.

Outros pesquisadores têm se dedicado a desvendar as enzimas envolvidas na biossíntese da vanilina, como Fock-Bastide *et al.*, 2014, identificaram genes que codificam as enzimas fenilalanina amônia-liase (VpPAL1) e uma 4-hidroxilase de cinamato (VpC4H1) em vagens de *V. planifolia*. Gallage *et al.*, (2014) em seus estudos demonstraram que uma única

enzima (VpVAN) sintase converte de forma direta o ácido ferúlico em glicosídeo vanilina, sendo específica para a substituição do anel aromático e não metabolizam ácido cafeíco e o ácido p-cumárico.

### 3.10 ELICITORES

Elicitores são compostos bióticos ou abióticos, que induzem respostas de defesa em células vegetais contra infecções microbianas, para garantir a sua sobrevivência, persistência e competitividade, aumentando a produtividade de metabólitos secundários em cultivos celulares vegetais, e aumentando a produção de fitoalexinas que são compostos com atividade antibiótica (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Um elicitor já estudado é o filtrado algal de *Haematococcus pluvialis* que adicionado ao meio de cultura, maximizou a produção de compostos fenólicos, em explantes *in vitro* de *Nidularium procerum*, a adição de 3 % deste filtrado possibilitou um incremento de 59,6 % na produção de quercetina após 60 dias de cultivo (GOLLO *et al.*, 2016).

### 3.11 PRECURSORES

Precursores são compostos adicionados aos cultivos, que estão presentes no metabolismo secundário das plantas, e podem influenciar de maneira positiva os intermediários de sua via biossintética (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Velankar & Heble, (2004) estudaram os efeitos da adição de p-hidroxibenzaldeído, ácido vanílico e ácido ferúlico ao meio de cultivo na produção de vanilina a partir de *V. planifolia in vitro*, encontraram vanilina, glicovanilina, p-hidroxibenzaldeído, álcool 4-hidroxibenzil, ácido vanílico e ácido ferúlico em diversos tipos de tecidos da planta. Westcott *et al.*, (1994) utilizaram o precursor ácido ferúlico em meio de cultivo contendo raízes aéreas de *V. planifolia* e obtiveram a produção de vanilina.

### 3.12 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

Existem vários métodos industriais para a extração comercial da vanilina e dos compostos derivados, a partir da vagem curada. O mais utilizado é a percolação e o método de oleoresinas. A percolação consiste na circulação de uma mistura de etanol e água, contendo 35-50 % de etanol, por 48 a 72 horas (SINHÁ *et al.*, 2008). O método de oleoresinas consiste em pulverizar as vagens inteiras, com etanol sob circulação a vácuo a 45°C, durante 8 a 9 dias. O excesso de etanol é removido por evaporação. A vantagem deste método é a obtenção de um extrato mais concentrado (RAO & RAVISHANKAR, 2000a).

Um método tradicional de extração consiste na imersão da amostra sólida em solvente contendo uma mistura de etanol e água a 30°C, em recipientes fechados com agitação por até 30 dias é considerado um processo barato e eficaz, mas muito demorado (WALISZEWSKI *et al.*, 2006).

Outro método muito empregado nas extrações (em escala laboratorial) utiliza um Soxhlet, processo em que o solvente lava as amostras sólidas e carrega os analitos que ficam retidos nos extratos. É um método simples e barato, mas um processo de extração lento (LUQUE-GARCÍA & CASTRO, 2004; JADHAV *et al.*, 2009). Outros métodos utilizados são considerados muito eficientes, como a extração assistida por micro-ondas (LONGARES-PATRÓN & CAÑIZARES-MACÍAS, 2006; DONG *et al.* 2014) e por ultrassom (VALDEZ-FLORES & CAÑIZARES-MACIAS, 2007; JADHAV *et al.*, 2009), pois possuem, baixo custo, alto poder extrator, tempo mais curto, e usam menos solventes. O uso de dióxido de carbono supercrítico tem sido uma opção estudada para extração em laboratório de vanilina, devido a sua alta eficiência de extração (NGUYEN *et al.*, 1991; VEGA *et al.*, 2016).

### 3.13 DETERMINAÇÃO DE VANILINA E COMPOSTOS RELACIONADOS

O método padrão de determinação de vanilina, a partir de extratos de vagens curadas, se baseia na hidrólise de vanilina. A medição é realizada com espectrofotômetro, com absorbância a 348 nm (AOAC, 1995), a determinação também pode ser realizada por espectroscopia de ultravioleta (AINSCOUGH & BRODIE, 1990).

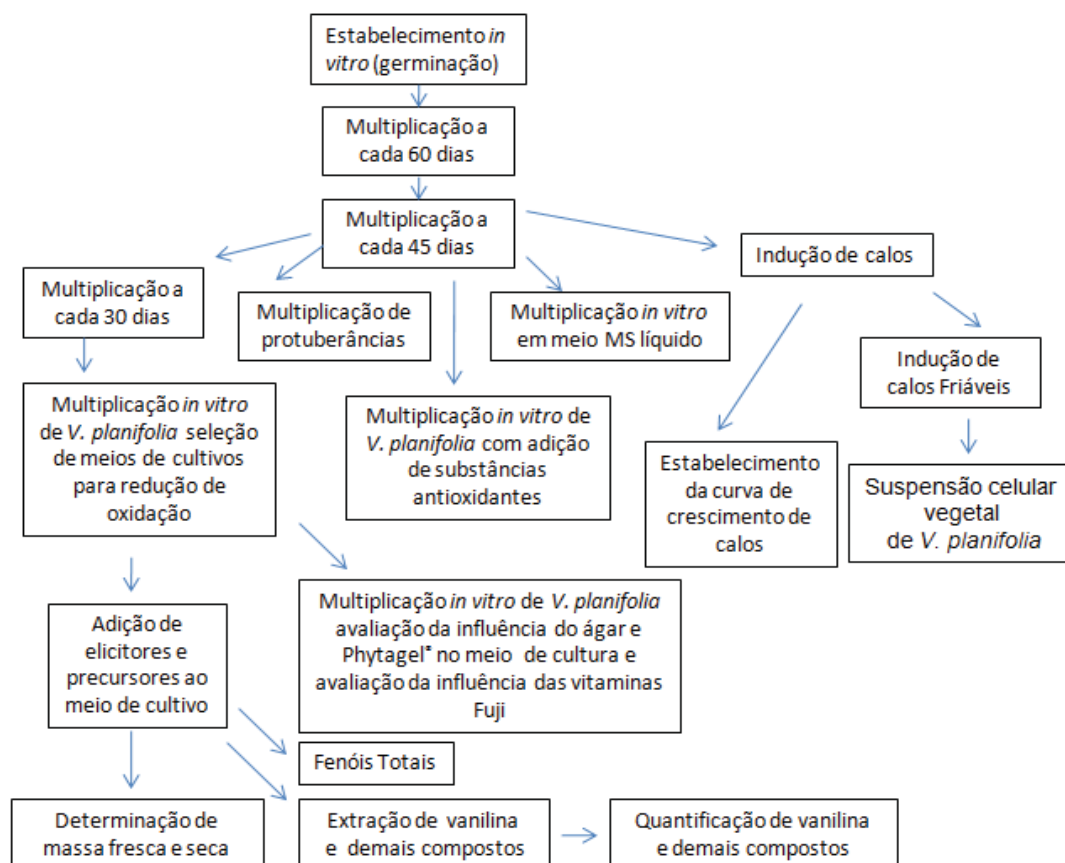
A determinação da vanilina e seus compostos são determinados por diversos métodos, considerados mais eficientes, pois atingem limites superiores de detecção. Entre os quais, a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (SHARMA *et al.*, 2006; SUJALMI *et al.*, 2005; BOYCE *et al.*, 2003; SHARRER & MOSANDI, 2001; JAGERDEO *et al.*, 2000; EHLERS, 1999; VOISINE *et al.*, 1995; LAMPRECHET *et al.*, 1994; NEGISHI & OZAWA, 1996); a cromatografia em camada delgada (BELAY & POOLE, 1993); cromatografia a gás com detector de ionização de chama (SOSTARIC *et al.*, 2000); a detecção por espectrometria de massa (PERES-SILVA *et al.*, 2006; HARTMAN *et al.*, 1992) e por sensores eletroquímicos (BETTAZZI *et al.*, 2006).



#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

A partir do estabelecimento *in vitro* da *Vanilla planifolia* (Figura 3), foram realizadas multiplicações da cultura, para obter um número maior de explantes para realizar os demais experimentos, foram avaliados meios de multiplicação sólido e líquido, meios com adição de substâncias antioxidantes para controlar os problemas de oxidação dos explantes. Buscou-se na literatura meios de multiplicação que fossem eficientes na proliferação de explantes, e que tivessem em sua composição adição de substâncias antioxidantes para evitar a oxidação. Foram avaliados hormônios vegetais na indução de calos e calos friáveis para utilização em suspensão celular. Avaliados a influência de ágar e Phytigel® e da adição de vitaminas Fuji na multiplicação *in vitro* de *V. planifolia*. Foram avaliadas a adição de fenilalanina, ácido ferúlico, cisteína e vitaminas Fuji, no aumento de compostos fenólicos e na produção de ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico.

Figura 3: Sequência de experimentos realizados com *Vanilla planifolia* para produção de vanilina.



#### 4.1 ESTABELECIMENTO DA CULTURA *IN VITRO*

A *Vanilla planifolia* foi estabelecida *in vitro* através da germinação de sementes da *V. planifolia*, foram utilizadas vagens maduras que foram desinfetadas pela imersão em etanol 95%, flambadas e apagadas rapidamente. A vagem foi aberta e as sementes foram retiradas e transferidas para meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina, 20 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar (DIVAKARAN & BABU, 2009).

#### 4.2 MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* UTILIZADO PARA *Vanilla planifolia*

O meio MS (Murashige & Skoog, 1962) foi utilizado na micropropagação e multiplicação de *V. planifolia in vitro*, cuja composição está descrita nas Tabelas 2 e 3. Foram preparados 1 L de cada solução estoque, conforme a concentração descrita nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2: Composição dos sais do meio MS

Soluções estoque	Sais	Concentração final (mg.L <sup>-1</sup> )
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1,650
B	KNO <sub>3</sub>	1,900
C	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25
	KI	0,83
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025
D	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440
	ou CaCl <sub>2</sub>	332
E	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
	MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,30
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025
F	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,80
	Na <sub>2</sub> .EDTA	37,30

Tabela 3: Composição das vitaminas do meio MS

Soluções estoque	Vitaminas	Concentração final (mg.L <sup>-1</sup> )
G	Ácido nicotínico	0,5
H	Piridoxina.HCl	0,5
I	Tiamina. HCl	0,1
J	Glicina	2,0
K	Mio-inositol	100

Cada solução foi aferida em balão volumétrico e após o preparo, com o auxílio de um funil, verteu-se em frascos âmbar de 1000 mL, foram armazenadas em geladeira a 8°C.

#### 4.3 PREPARO DE MEIO DE CULTURA MS

Em um béquer de 1000 mL, foram pipetados 20 mL das soluções estoque denominadas por letras A e B, 5 mL das soluções estoque C, D, E, F e 10 mL das soluções G, H, I, J, K, adicionou-se 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, completou-se com água destilada até atingir o volume 1000 mL, ajustou-se o pH para 5,8 com o uso de solução NaOH 0,1 N e/ou solução CH<sub>3</sub>COOH 0,1 N.

#### 4.4 CONDIÇÕES GERAIS DE CULTURA *IN VITRO*

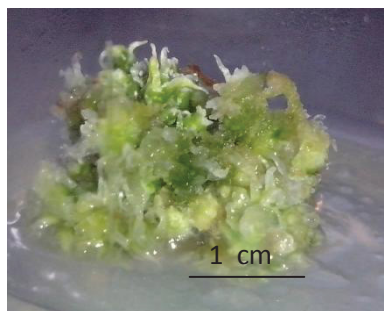
Todas as culturas *in vitro*, respectivas a cada experimento foram mantidas em sala de crescimento, sob luz fluorescente branca fria com intensidade luminosa de 40 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>, fotoperíodo de 16 h e temperatura de 25 ± 2°C.

As culturas foram realizadas em frascos de vidro de 5 cm de diâmetro e 8,5 cm de altura, contendo 30 mL de meio de cultura cada um, vedados com tampa de polipropileno rígido. Todos os meios de cultura foram autoclavados a 120°C, 1 kgf.cm<sup>2</sup> por 20 minutos. Todos os procedimentos de inoculação dos explantes aos meios de cultura foram realizados em capela de fluxo laminar devidamente desinfestada.

#### 4.5 MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO DE EXPLANTES *IN VITRO*

Após a germinação, as sementes foram transferidas para meio de multiplicação, utilizando o meio MS, suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de 6-benzilaminopurina (BAP) e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido indol-butírico (AIB) (DIVAKARAN & BABU, 2009), acrescido de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $7 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar. Este material foi transferido para um meio novo a cada 30 dias, sem repicagens, por um período de 12 meses. Após este período formaram-se massas celulares heterogêneas de *Vanilla planifolia* (Figura 4). Todos os experimentos subsequentes foram realizados a partir desta biomassa.

Figura 4: Biomassa celular heterogênea de *Vanilla planifolia* obtida do cultivo *in vitro*



Iniciou-se o processo de multiplicação repicando as biomassas, para aumentar o número de explantes, que seriam utilizados nos testes seguintes. Através de cortes na biomassa celular com cerca de  $1 \text{ cm}^2$ , isolando e transferindo para o meio de cultura MS fresco. Esta multiplicação foi realizada a cada 60 dias, por duas vezes (i.e. duas repicagens), com 20 frascos contendo cinco explantes cada, com o intuito de regenerar o material e diminuir a habituação do material *in vitro*, sendo avaliada a porcentagem de sobrevivência, após 60 dias de cultivo. Depois desse período, os repiques foram realizados a cada 45 dias, por três vezes (i.e. três repicagens), para diminuir o tempo entre os repiques e estimular a planta a se regenerar mais rápido e aumentar as taxas de multiplicação dos explantes, sendo avaliada a sobrevivência dos explantes. Foi observado que alguns frascos nos cultivos anteriores apresentaram oxidação, então neste cultivo também foi avaliada a

porcentagem de oxidação dos explantes. Foram utilizados 15 frascos contendo três explantes cada.

A porcentagem de oxidação foi avaliada visualmente conforme tabela 4, em que foram dados notas conforme a porcentagem de oxidação que cobriam o explante. Este método foi estabelecido para extratificar resultados mais precisos, em relação às metodologias de avaliação usual que não são tão precisas.

Tabela 4: Correspondência entre nota e porcentagem de oxidação utilizada na avaliação dos explantes

Notas de Oxidação	Varição de porcentagem de oxidação cobrindo o explante
1	0 (sem oxidação)
2	1 – 25%
3	26 – 50%
4	51 – 75%
5	76 – 100%

#### 4.6 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PROTUBERÂNCIAS

Foram isolados protuberância de *V. planifolia*, para avaliar o potencial destes explante de se multiplicarem, transferidos para meio de cultura MS sólido suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de 6-benzilaminopurina (BAP) e 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indol-butírico (IAB) (DIVAKARAN & BABU, 2009), acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar. A avaliação da porcentagem de sobrevivência ocorreu após 45 dias.

#### 4.7 CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS LÍQUIDO

Explantes (i.e. massa celular) com cerca de 1 cm<sup>2</sup>, foram utilizados para multiplicação em meio MS líquido, sem adição de ágar, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Foram inoculados cinco frascos com três explantes cada,

para avaliar a tolerância dos explantes desta planta ao meio líquido e possível multiplicação em biorreator. Avaliação ocorreu após 30 dias.

#### 4.8 INDUÇÃO DE CALOS

A indução de calos foi realizada com explantes de biomassa celular com cerca de 0,8 cm<sup>2</sup>, em meio MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ácido naftaleno acético (ANA), acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar (DIVAKARAN & BABU, 2009). Foram inoculados 10 frascos com quatro explantes cada. A cultura foi mantida inicialmente no escuro por cinco dias. Avaliação ocorreu após 45 dias. A porcentagem de formação de calo foi avaliada visualmente conforme Tabela 5, em que foram dados notas conforme a porcentagem de formação de calo que cobriam o explante, seguinte a metodologia (adaptado) de Carvalho *et al.*, (2014).

Tabela 5: Correspondência entre as notas e porcentagem de formação de calos

<b>Notas de formação de calos</b>	<b>% de formação de calos</b>
1	0
2	1 – 25%
3	26 – 50%
4	51 – 75%
5	76 – 100%

Fonte: CARVALHO et al., 2014 (adaptado)

#### 4.9 INDUÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS

A indução de calos foi realizada utilizando biomassa de explantes com cerca de 0,8 cm<sup>2</sup> e transferidos para o meio de indução de calos, utilizando meio MS suplementado com combinações de picloram (entre 0 mg.L<sup>-1</sup> e 5,0 mg.L<sup>-1</sup>) e cinetina (entre 0 mg.L<sup>-1</sup> e 0,1 mg.L<sup>-1</sup>), acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Cada combinação foi realizada em triplicata, com quatro explantes cada. Após 60 dias a formação de calos foi avaliada conforme

Tabela 5, correspondência entre as notas e porcentagem de formação de calos (adaptado CARVALHO *et al.*, 2014).

#### 4.10 ESTABELECIMENTO DA CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS

Para determinar a curva de crescimento dos calos e identificar as fases de cinética de seu desenvolvimento. Foram utilizados 12 frascos com três explantes de biomassa cada, as massas (g) dos explantes foram determinadas em balança analítica a cada 25 dias, e transferidos para meio de cultivo novo, durante 125 dias. O percentual de crescimento dos calos é determinado pela fórmula (LAMEIRA, 1997):

$$\text{Crescimento (\%)} = \frac{mf - mi}{mf} * 100$$

Sendo,

mf = massa final do calo, g

mi = massa inicial do calo, g

A massa inicial foi considerada a partir do dia da inoculação.

#### 4.11 SUSPENSÃO CELULAR VEGETAL DE *Vanilla planifolia*

Os calos formados foram transferidos para placa de Petri estéril. Estes foram levemente macerados e utilizados como inóculo para cultivo em suspensão celular. A biomassa foi transferida para um Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio MS líquido, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose. Foi mantido sob agitação em agitador orbital a 75 rpm e temperatura de 25°C. Foi avaliado o crescimento celular a cada 15 dias, durante um período de 60 dias, realizando coleta de uma pequena alíquota do meio e observando em microscópio óptico com aumento de 400X.

#### 4.12 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Vanilla planifolia* COM ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Devido a grande ocorrência de oxidação dos explantes, foram realizados cinco tratamentos (Tabela 6) com a adição de compostos antioxidantes ao meio e condições de cultivo, foi utilizado o meio MS, suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de IAB, acrescido de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e  $7 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar. O tratamento O2 foi mantido em ambiente escuro durante sete dias e depois exposto as mesmas condições de iluminação dos demais tratamentos. Foram realizados cinco tratamentos, com cinco repetições contendo cinco explantes por frasco. Foi avaliada a porcentagem de oxidação após 30 dias.

Tabela 6: Condições dos tratamentos realizados em meio de multiplicação MS com adição de substâncias antioxidantes e condições de cultivo

Tratamento	Meio MS
O1	no claro
O2	no escuro ( 7 dias)
O3	com adição de $100 \text{ mg.L}^{-1}$ de ácido ascórbico
O4	com adição de 1,5% carvão ativado
O5	com redução de 50% da quantidade da solução estoque G de FeEDTA

#### 4.13 SELEÇÃO DE MEIOS DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* PARA *Vanilla planifolia*

Neste experimento foram avaliados quatro meios de multiplicação descritos na literatura. Todos os explantes foram padronizados com cortes de  $1 \text{ cm}^2$  e embebidos durante o corte em 1ml de solução antioxidante, composta por  $250 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido ascórbico,  $25 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido cítrico e  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de PVP-40 polivinilpirrolidona, o pH foi ajustado para 5,0 e a solução foi microfiltrada ( $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ ) (TOURNIER *et al.*, 2003). Os experimentos foram realizados dentro da câmara de fluxo com a luz apagada, determinadas as massas iniciais dos explantes em balança analítica.

O tratamento 1 foi composto pelo meio MS, suplementado com 10% de água de coco (Sigma®),  $150 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido ascórbico,  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  de cisteína ,



2,15 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BAP) e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® (RAMOS-CASTELLÁ *et al.*, 2014).

O Tratamento 2 consistiu do meio MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® (RAMOS-CASTELLÁ *et al.*, 2014) .

O tratamento 3 foi realizado com meio MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina (KIN) e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® (ABEBE *et al.*, 2009).

E o tratamento 4 foi composto por meio MS com a metade da concentração de sais e suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® (ZURAIDA *et al.*, 2013).

Cada tratamento teve oito repetições com três explantes cada. Foram realizados subcultivos a cada 30 dias. As avaliações ocorreram após 30, 60, 90 e 120 dias e foram avaliados a área da superfície do explante (cm<sup>2</sup>), massa fresca (g), incremento de massa (vezes) (fórmula descrita no item 4.19), número de raízes, número de protuberâncias por explante, número de brotos por explantes, porcentagem de sobrevivência e de oxidação.

#### 4.14 INFLUÊNCIA DO ÁGAR E PHYTAGEL® NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Vanilla planifolia*

Foi escolhido o tratamento 2 do item 4.13 como meio basal para os demais testes. Foram realizados dois tratamentos, o primeiro consistiu no meio basal com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® . E o tratamento 2 foi composto pelo meio basal substituindo o Phytigel® por 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar.

Todos os explantes foram padronizados com cortes de 1 cm<sup>2</sup> e embebidos durante o corte em 1ml da solução antioxidante, descrita no item 4.13. Foram determinadas as massas iniciais dos explantes em balança analítica. Cada tratamento teve oito repetições com três explantes cada. Foram realizados subcultivos a cada 30 dias. As avaliações ocorreram após 30, 60, 90 e 120 dias e foram avaliados a área da superfície do explante (cm<sup>2</sup>), massa fresca (g), incremento de massa (vezes), número de raízes, número de protuberâncias por explante, número de brotos por explantes, porcentagem de sobrevivência e de oxidação.

#### 4.15 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE VITAMINAS FUJI NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Vanilla planifolia*

Foram realizados dois tratamentos utilizando o meio basal anteriormente selecionado, o qual consistiu do tratamento 2 do item 4.13. Os tratamentos consistiram em: (1) controle (ausência das vitaminas Fuji), (2) 2 mL.L<sup>-1</sup> e (3) 4 mL.L<sup>-1</sup> de vitaminas Fuji.

As vitaminas Fuji, são constituídas de 2,5 g.L<sup>-1</sup> de ácido nicotínico, 2,5 g.L<sup>-1</sup> de cloridrato de piridoxina, 0,5 g.L<sup>-1</sup> de tiamina. HCL, 50 g.L<sup>-1</sup> de mio-inositol e 1 g.L<sup>-1</sup> de glicina (SILVA *et al.*, 2007).

Todos os explantes foram padronizados com cortes de 1 cm<sup>2</sup> e embebidos durante o corte em 1mL da solução antioxidante, descrita no item 4.13. Foram determinadas as massa iniciais dos explantes em balança analítica. Cada tratamento teve oito repetições com três explantes cada. Foram realizados subcultivos a cada 30 dias. As avaliações ocorreram após 30, 60 e 90 dias e foram avaliados a área da superfície do explante, massa fresca (g), incremento de massa (vezes), número de raízes, número de protuberâncias por explante, número de brotos por explantes, porcentagem de sobrevivência e de oxidação.

#### 4.16 ACLIMATIZAÇÃO

O alongamento e enraizamento *in vitro* foram eficientemente induzidos em meio de cultura T2, os explantes foram subcultivados a cada 30 dias e aos 120 dias de cultivo, os brotos alongados foram isolados a partir da massa celular e colocados para alongar em meio T2 por mais 30 dias. Após este período as plantas completas tinham aproximadamente 7 cm de altura, foram removidas dos frascos e suas raízes foram lavadas em água corrente para retirada do meio de cultivo, envolvidas em papel toalhas para retirar o excesso de umidade e transferidas para os substratos. Foram avaliados dois sistemas de aclimatização, (experimento bifatorial 2x3) um em casa de vegetação com nebulização intermitente e outro em microestufa. Ambos os sistemas foram avaliados com três substratos. O substrato 1 (S1) foi preparado com a seguinte composição: areia média higienizada com hipoclorito de sódio 0,025%

e lavada 4 vezes com água destilada, carvão vegetal fragmentado com granulometria inferior a 10 mm também higienizado, cama de frango e solo (1: 1: 1 v/v). O substrato 2 (S2) foi composto com areia média, carvão vegetal fragmentado com granulometria inferior a 10 mm também higienizado, húmus de minhoca e solo (1: 1: 1: 1 v/v). O substrato 3 (S3) foi preparado com substrato comercial composto com casca de pinus tamanho média e húmus de minhoca (1:1 v/v).

Nos experimentos realizados na casa de vegetação com nebulização intermitente, as plantas enraizadas foram colocadas em tubetes de polipropileno com 4 cm de diâmetro e 12,5 cm de altura e preenchidos com 50 cm<sup>3</sup> de substrato. Já os experimentos realizados em microestufa, as plantas enraizadas foram transferidas para uma bandeja com células contendo 150 mL de substrato. Esta microestufa consistia numa caixa de plástico opaca (27x49 cm e 12 cm de altura) coberta com uma película de policloreto de vinila contendo cavidades (1 cm<sup>2</sup>) com uma distância de 10x10 cm. No interior da microestufa foi mantida uma camada de água de 1,5 cm para aumentar a umidade. A umidade dentro desta microestufa permaneceu aproximadamente 70%. Esta microestufa foi armazenada na sala de crescimento. A bandeja permaneceu acima da camada de água para evitar excesso de umidade para as plantas. Cada semana pulverizou-se água dentro da microestufa para manter a umidade.

O período de cultura em diferentes sistemas de aclimatização (microestufa e casa de vegetação com nebulização intermitente) foi de 15 dias, após este período as plantas foram transferidas para estufa sem nebulização por 15 dias (ou seja, total de 30 dias de cultura), sendo realizada irrigação diária. Foi avaliada a porcentagem de sobrevivência após 30 dias de cultivo *ex vitro*.

#### 4.17 ADIÇÃO DE ELICITORES E PRECURSORES

Foram realizados cinco tratamentos com a adição de elicitores e precursores ao meio de cultivo sólido (i.e. tratamento 2 descrito no item 4.13 com modificação para cada tratamento descritas a seguir) utilizando explantes padronizados com cortes de 1 cm<sup>2</sup>. No tratamento CO, o meio MS foi

suplementado com  $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB, acrescido de  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $7 \text{ g.L}^{-1}$  de ágar (DIVAKARAN & BABU, 2009).

No tratamento CA, o meio MS foi suplementado com  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado,  $2,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $2,2 \text{ g.L}^{-1}$  de Phytigel® (RAMOS-CASTELLÀ *et al.*, 2014), porém modificado com a remoção da cisteína.

No tratamento FE, suplementou-se o meio MS com  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  de cisteína,  $2,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $2,2 \text{ g.L}^{-1}$  de Phytigel® (RAMOS-CASTELLÀ *et al.*, 2014), porém modificado com a remoção do carvão ativado e com adição de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  de fenilalanina grau UV/HPLC (MerK®) microfiltrada ( $0,22 \text{ } \mu\text{M}$ ).

No tratamento FU, utilizou-se o meio MS suplementado com  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  de cisteína,  $2,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $2,2 \text{ g.L}^{-1}$  de Phytigel® (RAMOS-CASTELLÀ *et al.*, 2014), porém modificado com a remoção do carvão ativado e com adição de  $4 \text{ ml.L}^{-1}$  de vitaminas Fuji microfiltrada ( $0,22 \text{ } \mu\text{M}$ ) (SILVA *et al.*, 2007).

No tratamento A, o MS foi suplementado com  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  de cisteína,  $2,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $2,2 \text{ g.L}^{-1}$  de Phytigel® (RAMOS-CASTELLÀ *et al.*, 2014), porém modificado com a remoção do carvão ativado e com adição de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  de ácido ferúlico grau UV/HPLC (MerK®) microfiltrado ( $0,22 \text{ } \mu\text{M}$ ).

O tratamento T2 (meio basal) foi realizado com MS suplementado com  $35 \text{ mg.L}^{-1}$  de cisteína,  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de carvão ativado,  $2,15 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP,  $30 \text{ g.L}^{-1}$  de sacarose e solidificado com  $2,2 \text{ g.L}^{-1}$  de Phytigel® (RAMOS-CASTELLÀ *et al.*, 2014).

#### 4.18 TEOR DE FENÓIS TOTAIS

Os fenóis totais foram determinados utilizando o método modificado com base no reagente Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Foram extraídos os fenóis a partir de explantes de *V. planifolia* obtidos nos tratamentos com adição de elicitores e precursores descritos no item 4.17 aos 5, 10, 20 e 30 dias de cultivo. Foi realizada a maceração de explantes com metanol P.A. (1:10 p/v). Este macerado foi mantido em frasco escuro e vedado,

e mantido sob agitação a 75 rpm, por 24 horas, à temperatura ambiente. Em seguida, foi filtrado e utilizada uma alíquota de 500 µL (triplicatas), para a reação com 2,5 mL de solução de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v). Após 5 minutos, foram adicionados 2 mL Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (7.5% p/v) e armazenado à temperatura ambiente durante 60 min. A absorbância de todas as amostras foi determinada a 740 nm utilizando um espectrofotômetro de UV-SP2000. A curva padrão foi determinada utilizando ácido gálico com concentrações de 3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125 e 250 µg.mL<sup>-1</sup>. Metanol foi utilizado como branco. Os resultados foram expressos em equivalentes de ácido gálico em miligramas por g<sup>-1</sup> de massa fresca (mg GAE/g<sup>-1</sup> de massa fresca).

#### 4.19 DETERMINAÇÃO DE MASSA FRESCA E MASSA SECA

Foram determinadas a massa fresca e massa seca dos explantes com adição de elicitores e precursores descritos no item 4.17 aos 5, 10, 20 e 30 dias de cultivo.

Foram determinadas a massa fresca e a biomassa de *V. planifolia* em balança analítica. A partir da obtenção da massa fresca, foi calculado o incremento de massa utilizando a fórmula:

$$Im = \frac{mf2}{mf1}$$

Sendo,

Im= incremento de massa (vezes)

mf2= massa fresca final, g

mf1=massa fresca inicial, g

Para se determinar a porcentagem de massa seca, a biomassa foi pesada em balança analítica e seca em estufa de circulação forçada de ar, com temperatura de 70°C, até obter massa constante. O cálculo da porcentagem de massa seca foi realizado com a seguinte fórmula:

$$Massa\ seca\ (\%) = \frac{ms}{mf} * 100$$

Sendo,

mf= massa fresca, g

ms=massa seca, g

#### 4.20 EXTRAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO, P-HIDROXIBENZALDEÍDO, VANILINA E ÁCIDO FERÚLICO

Os explantes utilizados para a extração foram os descritos no item 4.17. As extrações foram realizadas em extrator Soxhlet marca Solab SL201. Explantes com 3 g foram macerados com bisturi e colocados em papel filtro e encaixado no equipamento. Foi utilizado 100 ml de etanol 99,8 % P.A. (JADHAV *et al.*, 2009). A temperatura do banho se manteve a 70°C e o tempo de extração foi de 8 h, em triplicata. A extração dos explantes foi realizada aos 5, 10, 20 e 30 dias de cultivo *in vitro*.

Após a extração, o solvente foi eliminado por evaporação em estufa com circulação de ar a 45°C. O extrato foi ressuspendido com 2 mL de etanol grau UV-HPLC (Merk®), a amostra foi mantida em freezer a -20°C.

#### 4.21 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO, P-HIDROXIBENZALDEÍDO, VANILINA E ÁCIDO FERÚLICO

Foi realizada análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com equipamento Varian Pro Star 350 com detector UV e coluna Eclipse XDB-C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm). A fase móvel consistiu de água ultra pura acidificada com ácido fórmico a 0,1% (v/v) e acetonitrila a 10% (fase A) e água acidificada com ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila a 30 % (fase B) conforme Overhage *et al.* (1999). O fluxo na coluna foi estabelecido a 0,7 mL/min, o comprimento de onda foi de 270 nm e o tempo de corrida de 30 minutos.

Para a análise quantitativa, os compostos padrões foram diluídos em água ultra pura. Neste caso foram utilizados o ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico grau UV/HPLC (Merk®). As concentrações dos padrões para elaboração da curva de calibração foram de 0,001; 0,002; 0,005, 0,007 e 0,01. g.L<sup>-1</sup>.

#### 4.22 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento usado foi inteiramente casualizado com número de repetições indicado nos experimentos descritos acima. Os dados foram submetidos à análise de variância e ao teste de Tukey (tratamentos qualitativos) e regressão (tratamentos quantitativos), ambos ao nível de 5% de probabilidade de erro. Os dados foram processados com auxílio do programa computacional GENES (CRUZ, 2001).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 MULTIPLICAÇÃO E REGENERAÇÃO DE EXPLANTES *IN VITRO*

Após um período de germinação de 180 dias, os protocórnios de *V. planifolia* foram sendo regularmente transferidas para o meio de cultivo MS sem repicagem do material, formando uma biomassa heterogênea e compacta. O material acabou se habituando ao meio de cultura e perdeu o seu potencial de diferenciação e regeneração (i.e. perdeu a juvenilidade), isso ocorre quando o material não é repicado por um longo período. Isso pode explicar a morte dos explantes e a baixa multiplicação, pois após 60 dias de multiplicação, não foi observado um aumento significativo na massa e nem diferenciação e regeneração de explantes, o que sugere que o material precisava recuperar a sua juvenilidade, indisponível para responder aos tratamentos.

As porcentagens de sobrevivência dos explantes (Tabela 7) variaram entre 70 e 75%. Esses explantes não sobreviveram, em sua maioria apresentavam sinais de oxidação, com mudança na coloração para marrom e escurecimento do meio de cultura ao redor da planta, que pode ter sido causada pela injúria dos tecidos na hora do corte.

Tabela 7: Avaliação de sobrevivência dos explantes após 60 dias de cultivo.

Período (dias)	% Sobrevivência
60	70 a <sup>1</sup>
60	75 a
CV %	35.9

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

As avaliações com 45 dias de multiplicação (Tabela 8) (Figura 5), apresentaram porcentagens de sobrevivências semelhantes, variando entre 73,3 e 80%. Estes explantes não apresentavam visualmente um aumento de massa, mas uma melhora na diferenciação e regeneração, apresentando o início de protuberâncias e alguns brotos. Comparando os resultados de 60 e 45 dias não houve mudanças significativas no aumento da sobrevivência, então o tempo de multiplicação foi diminuído para 30 dias, para tentar induzir a planta a



se regenerar e diferenciar mais rápido e aumentar o número de explantes multiplicados.

TAN *et al.*, (2011), em seu estudo cita a dificuldade da micropropagação de plântulas de *V. planifolia*, que exigem cuidados na manipulação dos explantes e apresentam baixa sobrevivência durante os subcultivos.

Tabela 8: Avaliação de oxidação e sobrevivência dos explantes após 45 dias de cultivo.

Períodos (dias)	% Oxidação	% Sobrevivência
45	29.6 a <sup>1</sup>	73.3 a
45	24.1 a	80.0 a
45	24.9 a	73.3 a
CV %	29.5	35.9

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

Figura 5: Multiplicação de *V. planifolia* após 45 dias de cultivo.



Quanto à oxidação observou-se porcentagens entre 24,1 e 29,6% dos explantes (Figura 6 e 7). A oxidação é caracterizada pela liberação de compostos fenólicos pela planta devido ao dano causado nas células durante a excisão dos explantes, causando a morte dos tecidos vegetais.

Lee-Espinosa *et al.*, (2008) comentam em seu trabalho que os protocolos de multiplicação com a *V. planifolia* ainda são pouco eficientes, provavelmente pelos compostos fenólicos que são exudados dos tecidos dos explantes durante o estabelecimento *in vitro*, mas não descrevem nenhum procedimento que possa ser utilizado para diminuir este problema, outros autores descrevem protocolos de multiplicação utilizando meios de cultivo com

suplementação de substâncias antioxidantes, mas não relatam o problema de oxidação, embora estejam utilizando meios para amenizar a oxidação dos explantes.

Figura 6: Explantes de *V. planifolia* após 15 dias em meio de cultivo, em início do processo de oxidação.

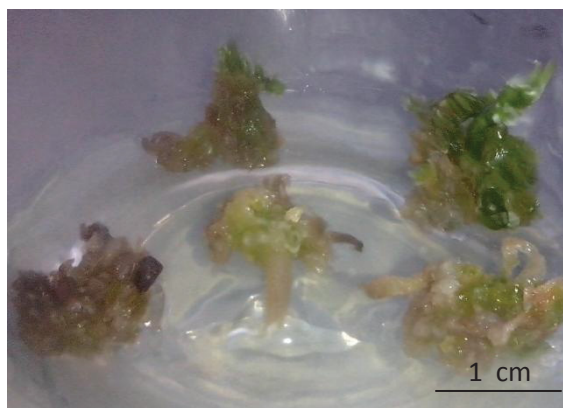


Figura 7: Oxidação total dos explantes de *V. planifolia* e liberação de compostos fenólicos no meio de cultura, após 45 dias de cultivo.



## 5.2 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE PROTUBERÂNCIAS

Entre as 20 protuberâncias de *V. planifolia* (Figura 8) isoladas e avaliadas após 45 dias apenas três explantes sobreviveram, correspondendo a 15% de regeneração. Estes apresentaram crescimento lento, não sendo viável o uso deste tipo de explante para a multiplicação, sugerindo o uso de explantes mais desenvolvidos (maiores), como brotos. Provavelmente o teor de sais do interior dos explantes é menor do que o teor de sais do meio MS, por essa razão, a água do interior do explante foi dissipada para o meio de cultura,

considerando que a água se movimenta de um meio menos concentrado para um mais concentrado em busca do equilíbrio iônico (TAIZ & ZEIGER, 2006).

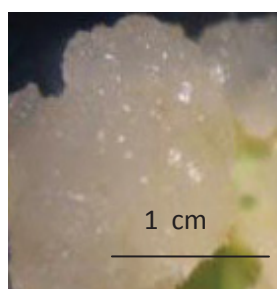
Figura 8: Protuberância de *V. planifolia* após 45 dias de cultivo *in vitro*.



### 5.3 CULTIVO *IN VITRO* EM MEIO MS LÍQUIDO

Foi observado que os explantes cultivados não toleraram o meio líquido. Pois 80% destes explantes, apresentaram hiperhidricidade (Figura 9) nos tecidos da planta. A hiperhidricidade é observada pelo estado fisiológico em que a planta apresenta elevado teor de água no interior das células e tecidos com aspecto translúcido, causando a morte dos explantes ou perda irreversível da multiplicação e potencial regenerativo (SREEDHAR *et al.*, 2009). Uma das principais causas da ocorrência da hiperhidricidade é o cultivo em meio líquido (SCHEIDT *et al.*, 2011). George & Ravishankar (1997), em experimentos com esta mesma espécie relataram que brotos cultivados em meio MS líquido durante 21 e 28 dias resultaram 81 e 41 %, respectivamente de sobrevivência, devido a atrofia e hiperhidricidade, já os brotos cultivados em 14 dias em meio líquido e subcultivado em meio semi-sólido, após 30 dias resultou em vigoroso crescimento e multiplicação.

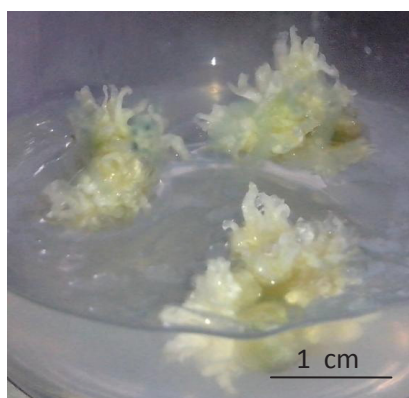
Figura 9: Hiperhidricidade de explantes de *V. planifolia* após 30 dias de cultivo em meio MS líquido.



## 5.4 INDUÇÃO DE CALOS

Massas celulares heterogêneas albinas (Figura 10) cultivadas originalmente em meio MS contendo  $1 \text{ mg.L}^{-1}$  de BAP e  $0.5 \text{ mg.L}^{-1}$  de AIB foram utilizadas para a indução de calos friáveis nos meios contendo BAP e ANA. A indução de calos utilizando BAP e ANA, não foi eficiente, pois não houve formação significativa de calos (variou de 0 a 5%).

Figura 10: Variação epigenética em explantes de *V. planifolia* cultivada em meio contendo BAP e AIB.



Observou-se que explantes que apresentavam a coloração albina, aproximadamente 35% destes regeneraram a pigmentação verde quando submetidas aos meios de cultivo contendo BAP e ANA. Esta alteração de coloração deve-se provavelmente a uma variação epigenética, em que tais alterações não ocorrem em nível de DNA, não sendo propagada para as próximas gerações (SILVA *et al.*, 2008). As causas das variações epigenéticas ainda não são totalmente conhecidas na micropropagação vegetal. Entretanto, sabe-se que alterações pós-traducionais como acetilações e metilações podem estar envolvidas (TAIZ & ZEIGER, 2006).

## 5.5 INDUÇÃO DE CALOS FRIÁVEIS

Em experimento subsequente foi avaliado o uso do picloran, uma auxina sintética, combinado com a cinetina com o objetivo de induzir calos friáveis. A cinetina (KIN), uma citocinina que combinada com uma auxina pode promover um efeito sinérgico maximizando o efeito dessa auxina. Entretanto,

foi observada pouca formação de calos (Tabela 9) e muitos explantes apresentavam morfologia de calos aquosos (i.e. calos hiperhídricos).

Além disso, muitos explantes apresentavam oxidação fenólica, com mudança de coloração dos explantes e escurecimento do meio de cultivo ao redor dos explantes. Possivelmente esta oxidação pode ter ocorrido pelo tamanho do corte inicial do explante (DEBERGH & ZIMMERMAN, 1991). Tanto a oxidação como a formação de calos aquosos podem ter sido causados pela resposta da planta à adição dos hormônios e pelas próprias características genéticas da planta.

Tabela 9: Avaliação de formação de calos de *V. planifolia* nos tratamentos com diferentes concentrações de picloram e cinetina

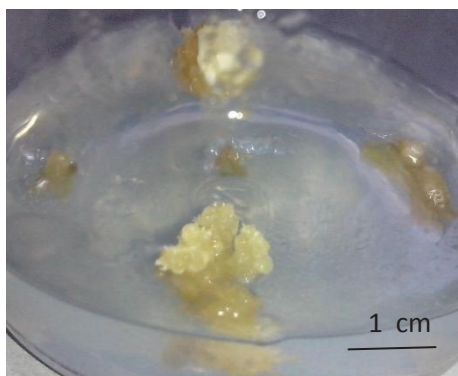
Picloram (mg.L <sup>-1</sup> )	Cinetina (mg.L <sup>-1</sup> )	% Formação de calos	% Oxidação	% Sobrevivência
0	0	0 a <sup>1</sup>	6.3 a	91.6 a
0.25	0	0 a	12.5 a	83.3 a
0.25	0.1	13.0 a	1.0 a	100 a
0.5	0	0 a	21.1 a	75.0 a
0.5	0.1	8.6 a	8.5 a	83.3 a
1.0	0	0 a	13.6 a	83.3 a
1.0	0.1	0 a	19.0 a	75.0 a
2.5	0	12.6 a	3.1 a	100 a
2.5	0.1	0 a	11.5 a	91.6 a
5.0	0	0 a	24.1 a	66.6 a
5.0	0.1	0 a	27.2 a	66.6 a
CV %		22.9	76.6	21.8

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

Calos foram obtidos (Figura 11) com concentrações de 0,25 mg.L<sup>-1</sup> de picloram e 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina, com 13 % de calogênese. Carvalho *et al.* (2015), em estudos com *Passiflora gibertii*, obtiveram bons resultados com a adição de picloram e cinetina, evidenciando que a adição dessa combinação de reguladores de crescimento ao meio de cultura promove maior formação de calos em explantes foliares do que utilizando 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético), hormônio bastante utilizado na formação de calos na *Vanilla*.

O uso de picloram na concentração de  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ , e mantendo a mesma concentração de cinetina  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cinetina, apresentou uma menor porcentagem de formação de calo e uma textura aquosa e escurecimento do meio de cultura. Segundo Grando *et al.* (1993), calos aquosos são formados por tecidos esponjoso branco translúcido sem consistência e não apresentam capacidade de regeneração. A adição de  $2,5 \text{ mg.L}^{-1}$  de picloram também induziu a formação de calos de 12,6%. Chaim *et al.* (2015), observaram alta proliferação de calos em *Passiflora* spp., obtidos em meio de cultura utilizando somente uma auxina, picloram ou 2,4-D.

Figura 11: Calos de *V. planifolia* após 60 dias de cultivo em meio MS com  $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$  de picloram e  $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$  de cinetina.



## 5.6 CURVA DE CRESCIMENTO DE CALOS

A curva de crescimento de calos (Figura 13) foi determinada a partir das avaliações de massa fresca dos calos num intervalo de 25 dias. Os explantes foram obtidos de biomassa (Figura 12) com formação inicial de calos, foram determinadas as massas a cada 25 dias, durante 125 dias. Utilizando os pesos de massa fresca e aplicando a fórmula descrita no item 4.10, foi possível estimar a porcentagem de crescimento dos calos (Figura 14) no decorrer do tempo.

A curva de crescimento de calos apresenta cinco fases: lag, exponencial, linear, desaceleração e estacionária, apresentando uma curva sigmóide (SMITH, 1992), de acordo com trabalhos mais recentes com *Jatropha curcas*, apresentam seis fases, incluindo a última chamada de fase de declínio

(COSTA *et al.*, 2015). Contudo, a fase de declínio às vezes não é considerada, porque é uma fase em que as células começam a morrer.

Figura 12: Calos de *V. planifolia* utilizados como explante inicial para a curva de calos.

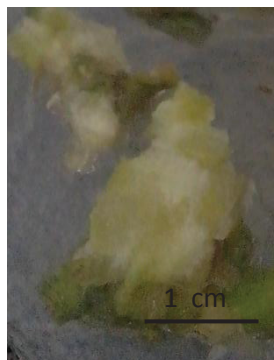
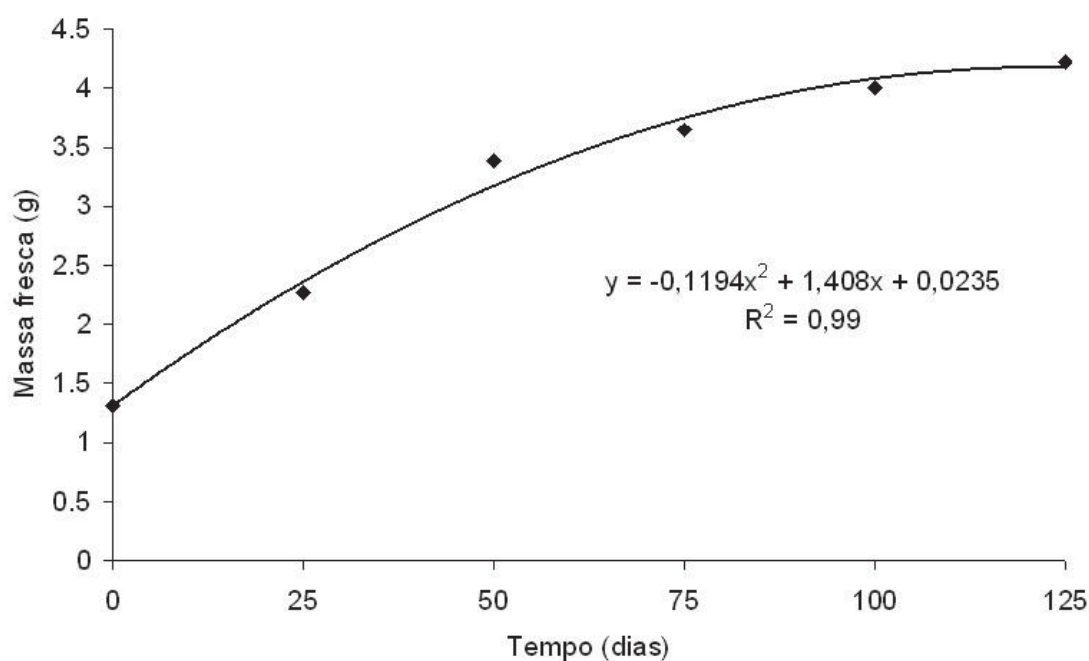


Figura13: Curva de crescimento de calos de *Vanilla planifolia*.

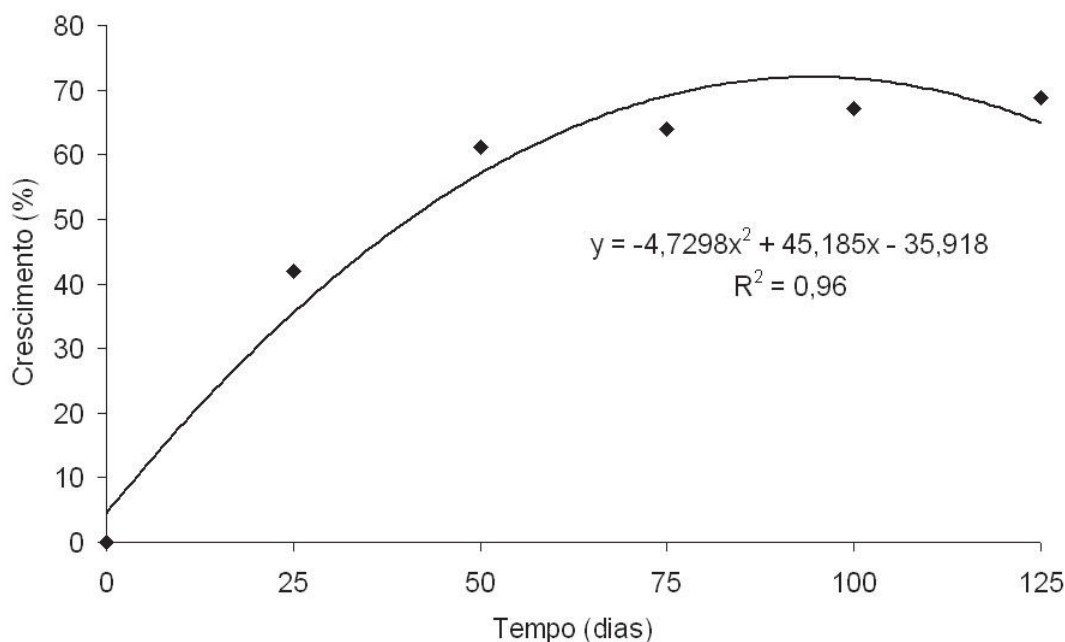


A curva de crescimento de calos não apresentou a fase lag, que é o início da preparação de divisão celular, e nem a fase exponencial, que devem ter ocorrido no tempo inferior ao início da avaliação de 25 dias, também pode ser explicado pelo uso do explante inicial que eram calos, que já estavam em divisão (i.e. oriundos de subcultivos). A curva se iniciou com a fase linear, que é caracterizada pela intensa divisão celular, permaneceu nesta fase no tempo 0 a 25 dias, a fase de desaceleração foi identificada no tempo de 25 dias até 50



dias. Smith (1992), recomenda que a fase de desaceleração está relacionada com a redução de nutrientes e devem ser feitas as repicagem nesta fase, indicando que os tempos de repicagens dos calos de *Vanilla planifolia* devem ocorrer a cada 25 dias. A fase estacionária foi percebida após 50 dias, não apresentando a fase de declínio no tempo analisado.

Figura 14: Curva de porcentagem de crescimento de calos de *Vanilla planifolia*.



### 5.7 SUSPENSÃO CELULAR VEGETAL DE *Vanilla planifolia*

Alíquotas da suspensão celular vegetal foram avaliadas a cada 15 dias por 60 dias, no microscópio óptico com lente de 400X. Não foi observado nenhum crescimento celular, possivelmente pelo calo não ser friável o suficiente para liberar células vegetais suspensas no meio de cultura.

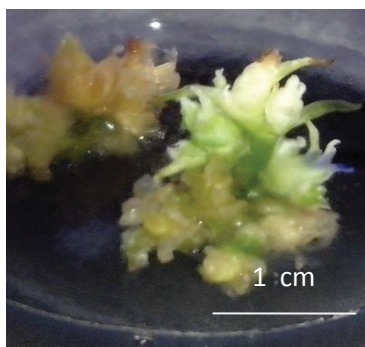
### 5.8 MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Vanilla planifolia* COM ADIÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

A oxidação de explantes (Figura 15) é um problema comum na micropropagação vegetal. Apesar da taxa de oxidação observada no presente



estudo ter variado de 18,2 a 27,3 % dos explantes (Tabela 10), não é considerada tão elevada, houve inibição do crescimento dos explantes, modificando a resposta morfogênética, e causando a liberação de compostos fenólicos *in vitro*. Esses compostos fenólicos são oxidados pelas enzimas polifenases, produzindo substâncias tóxicas, além de escurecer o meio de cultura (GRATTAPAGLIA & MACHADO, 1998).

Figura 15: Explante de *V.planifolia* em meio MS com carvão ativado.



Os distintos tratamentos realizados neste estudo não mostram diferenças estatisticamente significativas na redução da oxidação dos explantes de forma isolada. Segundo George (1996), o uso do carvão ativado adsorve os exudatos liberados pelo explante no meio de cultivo, que provocam a oxidação. Já o ácido ascórbico, reage com os metais presentes no meio de cultura, evitando que os mesmos fiquem disponíveis e se oxidem.

Segundo Peres (2002) e Marks & Simpson (1990), a manutenção inicial da cultura no escuro, evita a oxidação do explante, devido à inibição da ação de uma enzima dependente da luz, envolvida na produção de compostos fenólicos. Porém, em nossos resultados um prévio cultivo no escuro não reduziu a oxidação dos explantes (25.7% de oxidação) (Tabela 10).

De acordo com Utino *et al.*, (2001), a concentração de ferro influencia a oxidação de explantes, pois em seus estudos observou maiores oxidações em soluções mais concentradas. Entretanto, neste trabalho não foram observadas diminuições significativas da oxidação, utilizando estes mesmos antioxidantes já citados por estes autores, portanto foram avaliados novos meios de multiplicação utilizando outras formulações de compostos antioxidantes.

Tabela 10: Avaliação da porcentagem de oxidação nos tratamentos. O1- MS no claro, O2- MS no escuro, O3- MS com adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, O4- MS 1,5% carvão ativado, O5- MS redução de 50% da quantidade da solução de FeEDTA.

Tratamento	% Oxidação
O1	27.3 a <sup>1</sup>
O2	25.7 a
O3	23.2 a
O4	18.2 a
O5	25.8 a
CV %	19.5

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

### 5.9 SELEÇÃO DE MEIOS DE MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* PARA *Vanilla planifolia*

Após 30 dias de cultivo (Tabela 11) o tratamento 1 apresentou os melhores resultados de incremento de massa, maior área de superfície, também maior número de protuberâncias, mas também apresentou maior porcentagem de oxidação. Apesar do tratamento 1 ter apresentado bons resultados para algumas variáveis, ele não é indicado devido a ocorrência de oxidação, o que é altamente indesejável.

A cisteína presente no meio de cultivo T1 e T2 é um aminoácido que possui um grupo tiol na sua cadeia lateral que contém (-SH). Sendo um aminoácido completamente reativo, especialmente com oxigênio singlete e com radicais hidroxilas, a oxidação do tiol para dissulfeto (R1-S-S-R2, cisteína), a qual pode ser causada por diferentes espécies reativas de oxigênio, é um importante mecanismo de regulação redox do metabolismo (MØLLER *et al.*, 2007). Por essa razão é suplementada aos meios de cultura para reduzir a oxidação nos tecidos. Mas no tratamento 1 a adição de cisteína não resultou na redução da oxidação.

O tratamento 2 foi o que apresentou menor porcentagem de oxidação e maior número de brotos e raízes quando comparado com os demais tratamentos. O tratamento 2 aparentemente apresentou os melhores resultados provavelmente pelo fato de reduzir a ocorrência de oxidação. O excelente

resultado desse tratamento na redução da oxidação se deve provavelmente a presença do carvão ativado, devido a sua função de retenção de substâncias tóxicas presentes no meio de cultura, como, por exemplo, o 5-hidroximetilfurfural, o qual é produzido a partir da desidratação da sacarose durante a autoclavagem, ou de substâncias inibitórias presentes no ágar ou também por reduzir a ação de metabólitos tóxicos, tais como substâncias fenólicas, etileno e ácido abscísico que são eliminados pelo explante (THOMAS, 2008).

Tabela 11: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* após 30 dias de cultivo com meio MS em diferentes composições a cada tratamento.

Tratamento*	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
T1	1.8 a <sup>1</sup>	1.7 a	2.4 a	0.0 b
T2	1.5 a	0.9 ab	1.5 ab	0.2 a
T3	1.3 a	0.8 b	1.1 b	0.0 b
T4	1.8 a	1.1 a	1.5 ab	0.0 b
CV (%)	25.2	41.2	43.7	5.3

Tratamento*	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
T1	11.0 a	5.2 a	100 a	12.8 a
T2	9.7 a	6.7 a	100 a	4.3 a
T3	7.7 a	4.5 a	100 a	11.7 a
T4	8.1 a	5.1 a	100 a	10.0 a
CV (%)	13.9	26.9	0	45.9

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\* T1 = suplementado com 10% de água de coco (Sigma®), 150 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BAP) e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®; T2 = suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®; T3 = suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®; T4 = MS com a metade da concentração de sais e suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®.

Após 60 dias de cultivo, (Tabela 12) o tratamento 1 e 2 continuaram apresentando os melhores resultados. O tratamento 1 manteve a maior massa fresca e incremento de massa. O tratamento 2 obteve o maior número de protuberâncias, brotos, raízes e a menor porcentagem de oxidação.

Tabela 12: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* após 60 dias de cultivo com meio MS em diferentes composições a cada tratamento.

Tratamento*	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
T1	2.5 a <sup>1</sup>	2.4 a	3.3 a	0.0 b
T2	2.0 a	1.6 ab	2.4 ab	0.6 a
T3	1.7 a	1.1 b	1.5 b	0.0 b
T4	2.7 a	2.1 ab	2.9 ab	0.0 b
CV (%)	33.5	47.5	48.3	13.0
Tratamento*	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
T1	13.2 ab	6.9 a	100 a	22.2 b
T2	16.7 a	8.8 a	100 a	4.3 a
T3	7.0 c	7.1 a	100 a	31.0 b
T4	10 bc	8.6 a	100 a	24.1 b
CV (%)	13.9	23.0	0	58.8

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\* T1 = suplementado com 10% de água de coco (Sigma®), 150 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BAP) e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®; T2 = suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®; T3 = suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®; T4 = MS com a metade da concentração de sais e suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®.

Na avaliação dos tratamentos com 90 dias de cultivo (Tabela 13), o tratamento 1 apresentou maior incremento de massa. O tratamento 2 manteve o maior número de protuberâncias, brotos, raízes e menor porcentagem de oxidação. Já o tratamento 4 apresentou maior área de superfície e massa fresca.

No tratamento 3 foi observado que as variáveis avaliadas apresentaram resultados inferiores aos demais tratamentos após 90 dias de cultivo.

Comparando todos os tratamentos o que apresentou melhores resultados para a multiplicação foi o tratamento 2, pois obteve maior número de brotos e maior qualidade dos explantes. Além disso, o tratamento 2 apresentou a melhor coloração, com explantes verdes (Figura 16) e a menor porcentagem de oxidação, que era um problema recorrente neste trabalho. Este meio contendo carvão, cisteína e BAP foi utilizado no estabelecimento de gemas

auxiliares (RAMOS-CASTELLÁ *et al.*, 2014), após 3 subcultivos de 30 dias, houve a formação de brotos.

Tabela 13: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* após 90 dias de cultivo com meio MS em diferentes composições a cada tratamento.

Tratamento*	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
T1	4.7 ab <sup>1</sup>	3.0 a	4.1 a	0.0 b
T2	2.7 b	5.9 ab	3.5 a	2.3 a
T3	2.0 b	1.1 b	1.5 b	0.0 b
T4	6.8 a	6.8 a	2.9 a	0.0 b
CV (%)	61.8	48.4	46.6	26.8
Tratamento*	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
T1	17.1 ab	8.1 a	100 a	56.7 b
T2	20.5 a	11.1 a	100 a	3.71 a
T3	7.2 c	7.6 a	100 a	39.9 b
T4	11.7 bc	10.1 a	100 a	41.4 b
CV (%)	13.4	19.8	0	57.8

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\* T1 = suplementado com 10% de água de coco (Sigma®), 150 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BAP) e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®; T2 = suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®; T3 = suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®; T4 = MS com a metade da concentração de sais e suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®.

Ramos-Castellá *et al.* (2014) usando o mesmo tratamento 1 para a multiplicação de *V. planifolia*, obteve a formação de 10 brotos após 30 dias de cultivo. O tratamento 3 utilizado por ABEBE *et al.* (2009) resultou em 4,1 brotos após o segundo subcultivo de 45 dias a partir de segmentos nodais. O tratamento 4 proposto por ZURAIDA *et al.* (2013) formou 6,06 brotos após 40 dias de cultivo, a partir de segmentos nodais.

Segundo Diaz *et al.* (2012), a adequação e resposta aos reguladores de crescimento dependem do tipo de tecidos das plantas ou explantes utilizados. Respostas diferentes também podem ter ocorrido devido a diferenças genéticas entre as populações de *Vanilla planifolia*. Essas variações

genéticas frequentemente apresentam diferentes respostas *in vitro* mesmo dentro da mesma espécie.

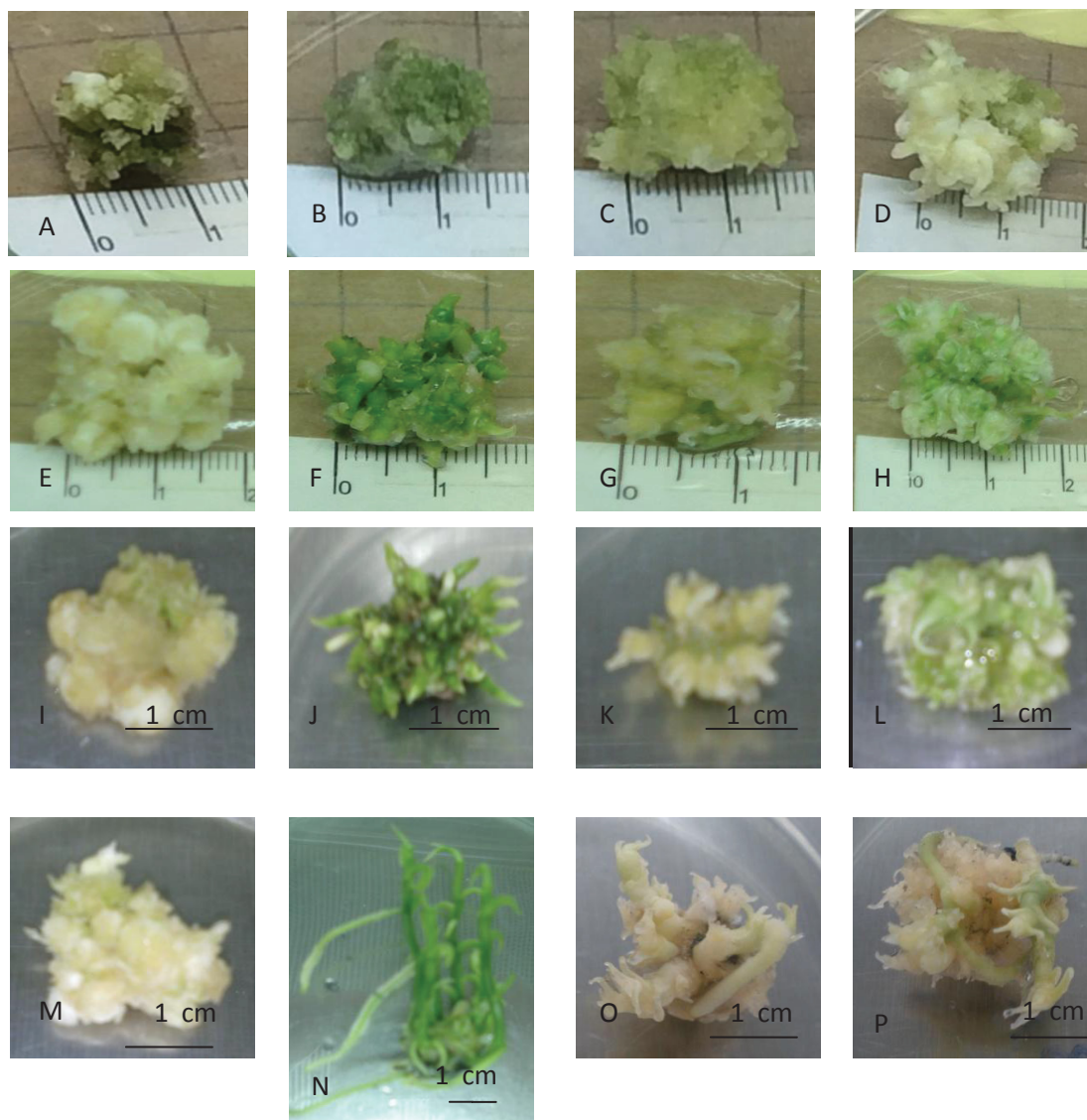
Figura 16: Explantes de *V. planifolia* após testes de multiplicação.

A- T1 após 30 dias, E- T1 após 60 dias, I- T1 após 90 dias e M- T1 após 120 dias.

B- T2 após 30 dias, F- T2 após 60 dias, J- T2 após 90 dias e N- T2 após 120 dias.

C- T3 após 30 dias, G- T3 após 60 dias, K- T3 após 90 dias e O- T3 após 120 dias.

D- T4 após 30 dias, H- T4 após 60 dias, L- T4 após 90 dias e P- T4 após 120 dias.



Após 120 dias de cultivo (Tabela 14), o tratamento 4 apresentou melhor resultado apenas na área da superfície do explante. Todos os demais variáveis avaliadas apresentaram melhor resultado no tratamento 2, além da maior produção de brotos já mencionado aos 90 dias, houve formação de plantas



completas, com uma média de 4 folhas por planta. Portanto o tratamento 2 foi indicado como meio basal para os demais experimentos.

Tabela 14. Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* após 120 dias de cultivo com meio MS em diferentes composições a cada tratamento.

Tratamento*	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa Fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
T1	6.6 a <sup>1</sup>	3.5 a	4.9 a	0 b
T2	4.4 ab	3.7 a	5.5 a	2.5 a
T3	2.2 b	1.3 b	1.7 b	0 b
T4	7.0 a	3.5 a	4.5 a	0 b
CV (%)	60.9	44.9	43.5	35.7

Tratamento*	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
T1	18.5 a	9.1 a	100 a	58.1 b
T2	21.5 a	11.5 a	100 a	5.9 a
T3	7.9 c	7.9 a	100 a	42.6 b
T4	13.0 b	10.5 a	100 a	44.1 b
CV (%)	13.4	18.3	0.0	47.7

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\* T1 = suplementado com 10% de água de coco (Sigma<sup>®</sup>), 150 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BAP) e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>; T2 = suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>; T3 = suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 1,5 mg.L<sup>-1</sup> de cinetina e 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>; T4 = MS com a metade da concentração de sais e suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 3 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel<sup>®</sup>.

## 5.10 INFLUÊNCIA DO ÁGAR E PHYTAGEL<sup>®</sup> NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Vanilla planifolia*

Após 30 dias de avaliação da influência do ágar e Phytigel<sup>®</sup> na multiplicação (Tabela 15), 60 dias (Tabela 16), 90 dias (Tabela 17) e 120 dias (Tabela 18).

O tratamento com ágar e Phytigel<sup>®</sup> apresentaram médias diferentes, mas não apresentaram resultados estatisticamente significativos entre si para todos os parâmetros avaliados como área de superfície (cm<sup>2</sup>), massa fresca

(g), incremento de massa (vezes), número de raízes, protuberâncias e brotos, e porcentagem de oxidação.

Tabela 15: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* em meio MS aos 30 dias de cultivo com diferentes agentes solidificantes.

Meios de cultivo*	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
Ágar	2.0 a <sup>1</sup>	1.3 a	1.9 a	0.0 a
Phytigel®	1.7 a	0.9 a	1.2 a	0.1 a
CV (%)	26.5	33.9	41.8	7.6
Meios de cultivo*	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
Ágar	16 a	3.8 a	100 a	5.0 a
Phytigel®	17 a	3.6 a	100 a	4.9 a
CV (%)	16.8	24.6	0	5.4

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\*Os meios foram suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e solidificados com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar ou 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Todos os meios foram suplementados com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5.8.

Tabela 16: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* em meio MS aos 60 dias de cultivo com diferentes agentes solidificantes.

Meios de cultivo*	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
Ágar	3.7 a <sup>1</sup>	1.9 a	2.8 a	0.5 a
Phytigel®	2.0 a	1.6 a	2.2 a	0.4 a
CV (%)	63.1	45.5	50.5	41.0
Meios de cultivo*	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
Ágar	17.8 a	5.4 a	100 a	5.0 a
Phytigel®	19.0 a	7.3 a	100 a	5.5 a
CV (%)	19.6	39.5	0	5.8

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\*Os meios foram suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e solidificados com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar ou 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Todos os meios foram suplementados com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5.8.



O uso destes agentes solidificantes, não influenciaram na multiplicação de *V. planifolia* (Figura 17 e 18) com meio basal (T2) utilizado neste tratamento. Portanto, sugere-se o uso de ágar como agente solidificante por ser mais barato.

Tabela 17: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* em meio MS aos 90 dias de cultivo com diferentes agentes solidificantes.

Meios de cultivo*	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
Ágar	4.7 a <sup>1</sup>	2.9 a	4.2 a	1.7 a
Phytigel®	2.6 a	2.7 a	3.6 a	2.3 a
CV (%)	66.1	72.5	75.5	50.0
Meios de cultivo*	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
Ágar	19.1 a	7.3 a	100 a	5.0 a
Phytigel®	21.7 a	9.1 a	100 a	6.1 a
CV (%)	18.2	36.2	0.0	5.9

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\*Os meios foram suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e solidificados com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar ou 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Todos os meios foram suplementados com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5.8.

Tabela 18: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* em meio MS aos 120 dias de cultivo com diferentes agentes solidificantes.

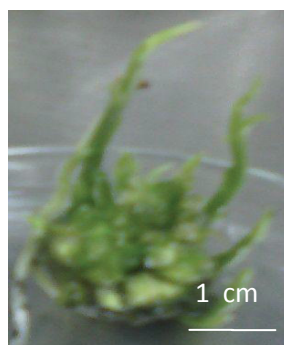
Meios de cultivo*	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
Ágar	5.1 a <sup>1</sup>	3.9 a	5.8 a	1.7 a
Phytigel®	4.0 a	3.7 a	4.9 a	2.4 a
CV (%)	59.1	82.1	86.8	39.1
Meios de cultivo*	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
Ágar	19.9 a	8.2 a	100 a	5.0 a
Phytigel®	22.1 a	10.5 a	100 a	6.1 a
CV (%)	17.9	33.7	0.0	5.9

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\*Os meios foram suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e solidificados com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar ou 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Todos os meios foram suplementados com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5.8.

Vários estudos demonstraram variações de respostas quanto ao crescimento de plantas *in vitro* com o uso de diferentes agentes solidificantes (SCHOLTEN & PIERIK, 1998). Estas diferenças podem ser atribuídas às características físico-químicas de cada agente solidificante que interferem na taxa de difusão dos nutrientes orgânicos e inorgânicos, além da interferência de impurezas e resistência do gel (DEBERGH, 1983; NAIRN *et al.*, 1995).

Figura 17: *V. planifolia* aos 120 dias de cultivo *in vitro* em meio basal com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®.



Nestáková *et al.* (2000) obtiveram o maior número de brotos, maior número de folhas por broto e massa fresca com o uso de Phytigel®, quando estudaram os efeitos dos agentes gelificantes, ágar e Phytigel®, sobre o crescimento *in vitro* e desenvolvimento de brotos de rosas (*Rosa* sp.).

Kaçar *et al.* (2010), em estudo com os mesmos agentes solidificantes, obtiveram um maior número de brotos de bananeira (*Musa* spp.), maior comprimento dos brotos e massa fresca com a utilização de ágar.

Figura 18: *V. planifolia* aos 120 dias de cultivo *in vitro* em meio basal com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar.



### 5.11 INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DE VITAMINAS FUJI NA MULTIPLICAÇÃO *IN VITRO* DE *Vanilla planifolia*

A influência da adição de vitaminas Fuji ao meio de cultivo basal, foi avaliada após 30 dias (Tabela 19), 60 dias (Tabela 20) e 90 dias (Tabela 21; Figuras 19 e 20) de multiplicação. Resultados estatisticamente significativos foram obtidos aos 30 dias (Tabela 19) com a adição de 2 ml.L<sup>-1</sup> de vitaminas, em relação à massa fresca e a uma menor porcentagem de oxidação. Com, a adição de 4 ml.L<sup>-1</sup> de vitaminas obteve o maior número de protuberâncias.

Aos 60 e 90 dias de avaliação não se verificou diferenças estatísticas entre os tratamentos, nos parâmetros avaliados área de superfície (cm<sup>2</sup>), massa fresca (g), incremento de massa (vezes) e número de raízes, protuberâncias e brotos, e porcentagem de oxidação. A adição das vitaminas Fuji ao meio de cultivo basal (T2) influenciou na multiplicação de *V. planifolia* por períodos de até 30 dias de cultivo.

Silva *et al.* (2012), em estudos com *Lagenaria siceraria* com a adição de 2 ml.L<sup>-1</sup> de vitaminas Fuji observaram que não houve diferenças significativas entre os explantes quanto ao número de folhas e brotos. Este mesmo autor em estudos com *Dyckia agudensis* e em *Dyckia maritima* observou que as vitaminas Fuji auxiliaram no desenvolvimento de brotações múltiplas (SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2008).

Figura 19: *V. planifolia* em meio cultivo basal com adição de 2 ml.L<sup>-1</sup> de vitaminas Fuji aos 90 dias de cultivo *in vitro*.



Tabela 19: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* aos 30 dias de cultivo em meio MS sob diferentes concentrações de vitaminas Fuji.

Vitamina Fuji* mL.L <sup>-1</sup>	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
0	1.6 a <sup>1</sup>	0.9 b	1.5 a	0,2 a
2	1.9 a	4.1 a	2.1 a	0.4 a
4	2,0 a	1.4 b	2.1 a	0.1 a
CV (%)	20.5	23.6	36.6	25.4
Vitamina Fuji* mL.L <sup>-1</sup>	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
0	9.7 b	7.0 a	100 a	4,3 ab
2	11.4 b	4.3 a	100 a	1,3 b
4	15.4 a	4.5 a	100 a	5,2 a
CV (%)	13.7	24.7	0	24.7

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\*O meio foi suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Os meios foram solidificados com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Todos os meios foram suplementados com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5.8.

Tabela 20: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* aos 60 dias de cultivo em meio MS sob diferentes concentrações de vitaminas Fuji.

Vitamina Fuji* mL.L <sup>-1</sup>	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
0	2.0 b <sup>1</sup>	1.6 a	2.5 a	0.6 a
2	3.4 a	2.4 a	3.9 a	2.7 a
4	2.9 a	2.2 a	3.3 a	1.9 a
CV (%)	30.4	43.1	52.2	52.9
Vitamina Fuji* mL.L <sup>-1</sup>	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
0	16.8 a	8.9 a	100 a	4.3 ab
2	18.9 a	8.8 a	100 a	1.3 b
4	18.8 a	9.3 a	100 a	5.2 a
CV (%)	12.8	36.1	0	24.7

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\*O meio foi suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Os meios foram solidificados com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Todos os meios foram suplementados com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5.8.

Figura 20: *V. planifolia* em meio cultivo basal com adição de 4 mL.L<sup>-1</sup> de vitaminas Fuji aos 90 dias de cultivo *in vitro*.

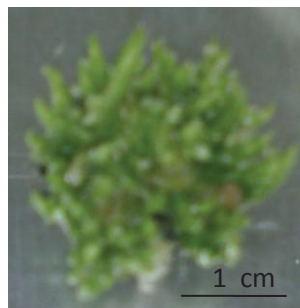


Tabela 21: Multiplicação *in vitro* de *Vanilla planifolia* aos 90 dias de cultivo em meio MS sob diferentes concentrações de vitaminas Fuji.

Vitamina Fuji* mL.L <sup>-1</sup>	Área da superfície do explante (cm <sup>2</sup> )	Massa fresca (g)	Incremento de massa (vezes)	Número de raízes por explante
0	2.8a	2.7 a	4.0 a	2.4 a
2	4.0 a	3.3 a	5.3 a	3.3 a
4	4.2 a	3.2 a	4.8 a	2.4 a
CV (%)	40.7	55.5	58.9	23.8
Vitamina Fuji* mL.L <sup>-1</sup>	Número de protuberâncias por explante	Número de brotos por explante	Sobrevivência (%)	Oxidação (%)
0	20.6 a	11.1 a	100 a	5.9 a
2	20.0 a	10.3 a	100 a	3.4 a
4	20.0 a	14.4 a	100 a	5.2 a
CV (%)	44.7	9.0	0.0	33.2

<sup>1</sup> Médias seguidas pela mesma letra nas colunas para cada parâmetro não diferem entre si ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste Tukey.

\*O meio foi suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP. Os meios foram solidificados com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Todos os meios foram suplementados com 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e pH ajustado para 5.8.

## 5.12 ACLIMATIZAÇÃO

O substrato S2 (Figura 21) foi o mais eficiente, cuja composição foi areia média, carvão vegetal, húmus e solo, 90 % das mudas micropropagadas sobreviveram em ambos os tipos de casas de vegetação (Tabela 22). Estes

substratos que formulamos possuem baixo custo e boa porcentagem de sobrevivência na aclimatização. E podem ser utilizados em alternativa aos substratos comerciais principalmente aos importados que possuem alto custo.

Os autores Ramos-Castellá *et al.* (2014) obtiveram 90 % de sobrevivência dos explantes com uma mistura de musgo de turfa (peat moss) e agrolita® (1:1 v/v) como substrato usado para o cultivo em ambiente protegido.

O substrato S3 não apresentou diferença significativa entre os tipos de casa de vegetação, sendo considerado também eficiente com 80% e 85%. Com os substratos S2 e S3 ambos com a presença de húmus de minhoca, obtiveram-se os melhores resultados de aclimatização.

Tabela 22. Avaliação de 30 dias de aclimatização em estufa sem nebulização e em casa de vegetação com nebulização intermitente com diferentes substratos.

Substrato*	Casa de vegetação sem nebulização (% sobrevivência)	Casa de vegetação com nebulização (% sobrevivência)
S1	50 bA <sup>1</sup>	35 bB
S2	90 aA	90 aA
S3	80 aA	85 aA
CV(%)	25.6	31.2

<sup>1</sup> Tratamentos seguidos com a mesma letra minúscula nas colunas e com a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

\* Composição dos substratos: substrato 1 (S1) areia média, carvão vegetal, cama de frango e solo (1: 1: 1: 1 v/v), o substrato 2 (S2) areia média, carvão vegetal, húmus e solo (1: 1: 1: 1 v/v), substrato 3 (S3) casca de pinus tamanho média e húmus (1:1 v/v).

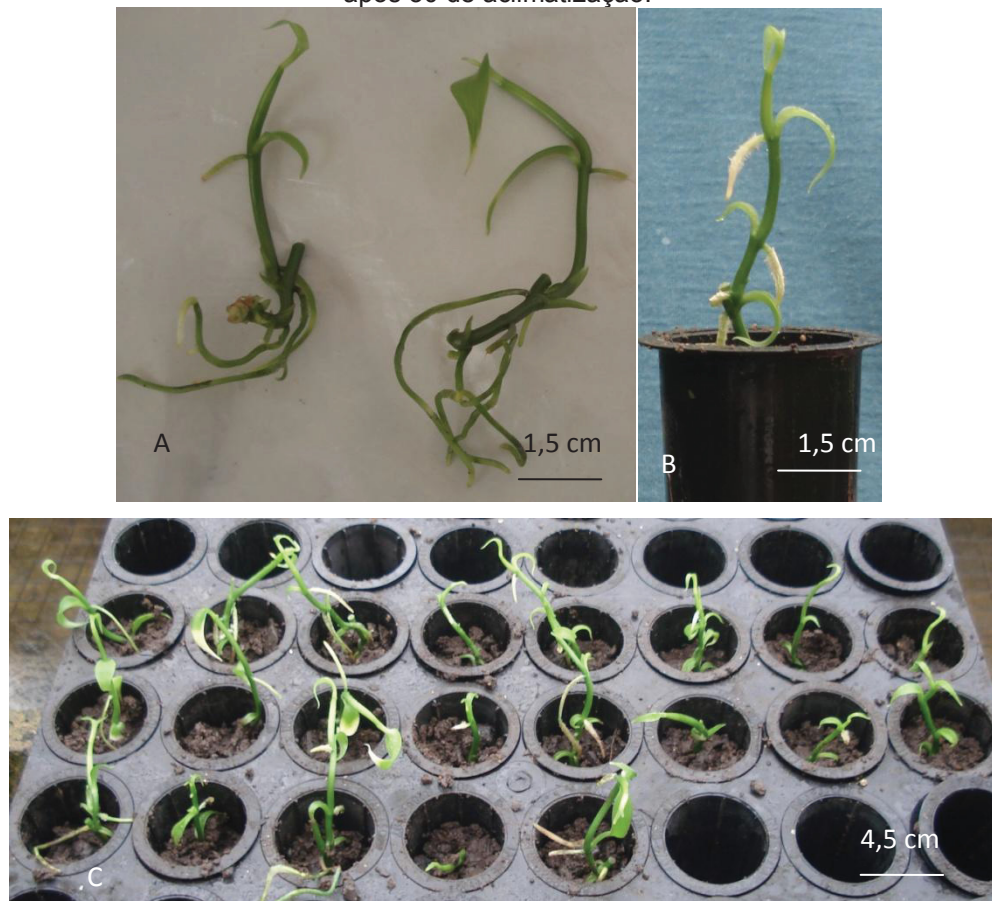
Os ácidos húmicos são conhecidos por apresentar efeitos positivos no crescimento e desenvolvimento, devido ao incremento no acúmulo de nutrientes e biomassa em diferentes espécies de plantas ornamentais (BALDOTTO *et al.*, 2009; 2013; ZANDONADI *et al.*, 2007).

Já o substrato S1 apresentou a menor porcentagem de sobrevivência das mudas micropropagadas com 35% em casa de vegetação com nebulização e melhor resultado em casa de vegetação sem nebulização com 50% de sobrevivência.

O substrato S1 que possui como um de seus componentes a cama de frango, possivelmente retêm mais umidade na casa de vegetação com nebulização, por isso obteve baixa sobrevivência dos explantes, quando comparado com os demais substratos. Pois o excesso de umidade interfere na

sobrevivência dos explantes, considerando que a *Vanilla* é pouco resistente ao excesso de umidade.

Figura 21: A- *V. planifolia* após enraizamento *in vitro* em meio de cultura T2 utilizadas na aclimatização. B- *V. planifolia* em tubetes para a aclimatização. C- *V. planifolia* em bandeja após 30 de aclimatização.



### 5.13 TEOR DE FENÓIS TOTAIS

A dosagem de compostos fenólicos totais presentes nas culturas testadas com a adição de precursores e elicitores ao meio de cultivo, mostram resultados distintos. Aqueles meios suplementados com vitaminas Fuji apresentaram (Tabela 23) as maiores concentração de fenóis totais em relação aos demais precursores. Com 30 dias foi obtida a maior concentração 1746,1 mg GAE/g<sup>-1</sup> de massa fresca, este equivale ao dobro da concentração de fenóis totais no controle. As vitaminas Fuji possuem diferentes compostos associados ao metabolismo vegetal, os quais podem ter influenciado de forma indireta na produção dos compostos fenólicos.



Os compostos fenólicos incluem fenóis, ácidos fenólicos simples (benzóico e derivados de ácido cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos hidrolisáveis e condensados, lignanas e lignina (BLAINSKI *et al.*, 2013). Sendo que alguns destes fenóis fazem parte da rota metabólica da vanilina, como o ácido vanílico, o p-hidroxibenzaldeído e o ácido ferúlico.

A adição de fenilalanina resultou também em maior concentração de fenóis aos 30 dias obteve 1229,9 mg/g<sup>-1</sup>. A fenilalanina é o aminoácido que proporciona o início da rota biossintética dos fenilpropanóides, sendo processado pela enzima fenilalanina amônia-liase (PAL), que é um importante passo regulatório na formação da maioria dos compostos fenólicos (TAIZ & ZEIGER, 2006).

Tabela 23: Fenóis totais obtidos a partir de explantes de *V. planifolia* em diferentes tratamentos\*, resultados expressos em (mg GAE/g<sup>-1</sup> de massa fresca).

Tempo (dias)	CO	T2	CA	A	FE	FU
5	685.8 bD <sup>1</sup>	1011.3 bC	1148.7aBC	1297.0 aB	1189.3 aB	1528.3 bA
10	531.1 cD	1420.3 aA	708.1 bC	1336.5 aA	704.6 bC	1123.3 cB
20	874.1 aC	827.14 cC	1157.1 aB	371.9 cD	1114.8 aB	1643.4abA
30	609.0bcD	1020.0 bC	474.6 cD	1087.2bBC	1229.9 aB	1746.1 aA
CV(%)	6.2					

<sup>1</sup> Tratamentos seguidos com a mesma letra minúscula nas colunas e com a mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade de erro.

\*Descrição dos tratamentos. CO: MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Tratamento CA: MS suplementado com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, sem cisteína. Tratamento T2: MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Tratamento A: MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, sem carvão ativado e com adição de 300 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ferúlico. Tratamento FU: MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, sem carvão ativado e com adição de 4 ml.L<sup>-1</sup> de vitaminas Fuji. Tratamento FE: MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® sem carvão ativado e com adição de 300 mg.L<sup>-1</sup> de fenilalanina.

Calos obtidos de explantes foliares jovens de *Pluchea lanceolata* (Asteraceae) foram exogeneamente suplementados com 50 mg/100 mL de fenilalanina e esses calos tiveram um aumento de quercetina (i.e. composto fenólico) para aproximadamente 1 a 2 vezes em comparação com o controle



(ARYA & PATNI, 2013). Esses resultados encontrados com a suplementação da fenilalanina são concordantes com os obtidos neste trabalho, considerando que a quercetina é um composto fenólico envolvido na rota dos fenilpropopanoídes.

O tratamento T2 apresentou maior concentração de fenóis aos 10 dias com concentração máxima de  $1420,3 \text{ mg/g}^{-1}$ . O tratamento CA apresentou maior concentração aos 20 dias com  $1157,1 \text{ mg/g}^{-1}$ , ambos tratamentos podem ter sido influenciados pela presença de carvão ativado que preservou os compostos fenólicos, evitando a degradação destes compostos. A adição de ácido ferúlico obteve uma concentração máxima aos 10 dias com  $1336,5 \text{ mg/g}^{-1}$ . O tratamento CO apresentou sua maior concentração aos 20 dias com  $874,1 \text{ mg/g}^{-1}$ .

#### 5.14 DETERMINAÇÃO DE MASSA FRESCA E MASSA SECA

Após 30 dias de cultivo (Figura 22) obtiveram-se os melhores resultados de massa fresca com vitaminas Fuji (FU), 2,01 g e com adição de fenilalanina (FE), 1,87g de massa fresca. No tratamento T2 a massa obtida foi de 1,13 g. Os tratamentos CA e CO resultaram em 1,11g de massa fresca. No tratamento A, com adição de ácido ferúlico, somente 0,70 g de massa foi obtida. Sendo indicados os tratamentos FU e FE para obter maior massa fresca após 30 dias de cultivo.

O incremento de massa (Figura 23) confirma os melhores resultados obtidos na massa fresca, pois o tratamento FE e FU apresentaram um incremento de massa de 10,5 e 9,0 vezes após 30 dias de cultivo, os demais tratamentos CA, A, T2 e CO obtiveram um incremento de massa 6,8; 6,7; 6,4 e 4,3 vezes, respectivamente. Os tratamentos FU e FE foram eficientes para promover o aumento de massa e também no incremento da massa fresca após 30 dias.

As maiores porcentagens de massa seca (Figura 24) após 30 dias de cultivo foram obtidas com os tratamentos FU e FE que apresentaram 15,2 e 14,4 % de massa seca. Os demais tratamentos T2, CO, CA e A resultaram em 13,4; 12,4; 11,9 e 10,3 % de massa seca, respectivamente.

A porcentagem de massa seca se relaciona com a perda de água do material vegetal, restando apenas matéria orgânica como carbono, hidrogênio, oxigênio e matéria inorgânica. Os tratamentos que tiveram melhor porcentagem de massa seca podem ser escolhidos para a produção dos compostos de interesse como o ácido vanílico, p-hidrobenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico.

Figura 22: Massa fresca (g) obtida a partir de explantes de *V. planifolia* cultivados *in vitro* com diferentes tratamentos\*<sup>1</sup>.

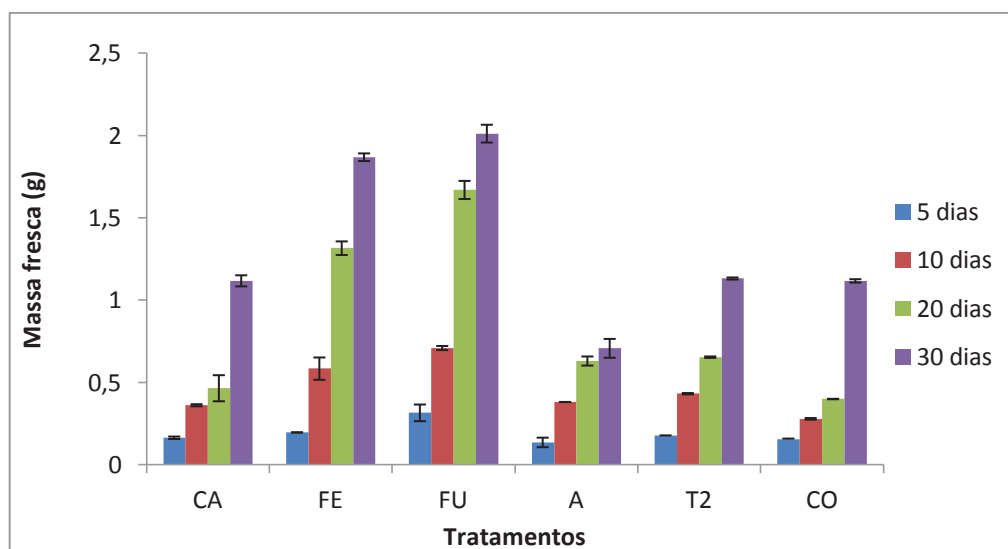


Figura 23: Incremento de massa (vezes) obtido a partir de explantes de *V. planifolia* cultivados em diferentes tratamentos\*<sup>2</sup>.

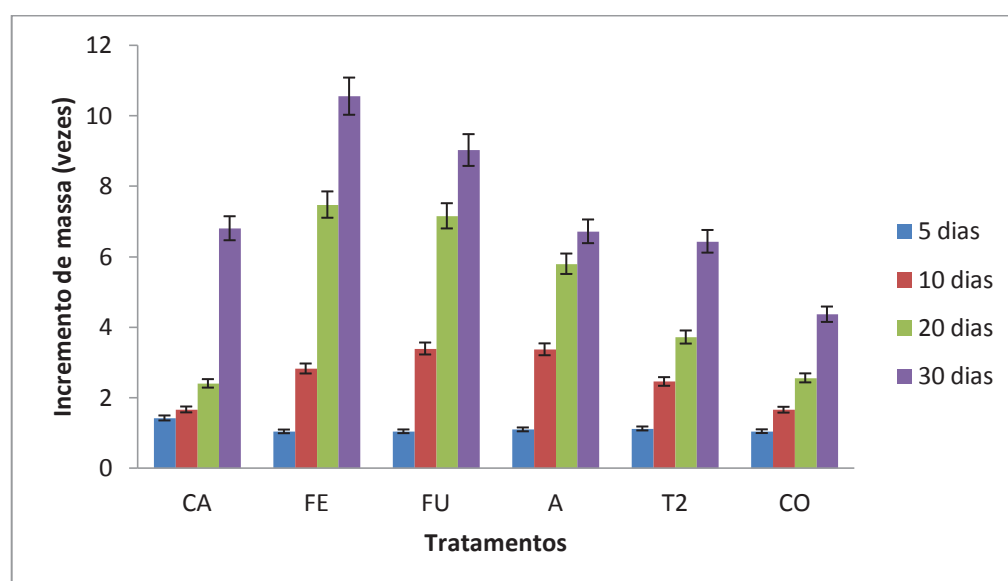
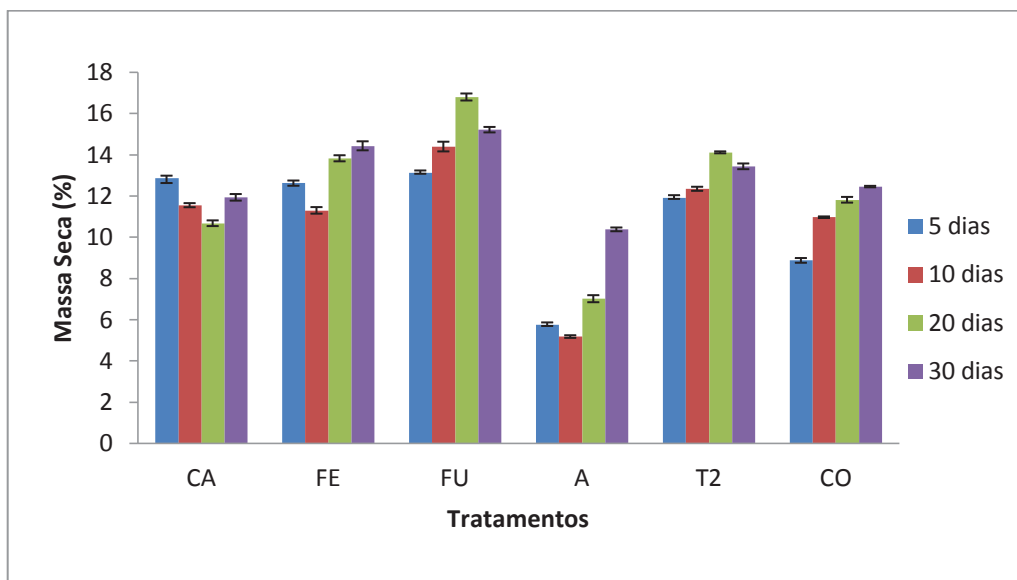


Figura 24: Massa seca (%) obtida a partir de explantes de *V. planifolia* em diferentes tratamentos\*<sup>3</sup>.



\*1, 2, 3 Descrição dos tratamentos. CO: MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar. Tratamento CA: MS suplementado com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, sem cisteína. Tratamento T2: MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®. Tratamento A: MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, sem carvão ativado e com adição de 300 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ferúlico. Tratamento FU: MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, sem carvão ativado e com adição de 4 ml.L<sup>-1</sup> de vitaminas Fuji. Tratamento FE: MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® sem carvão ativado e com adição de 300 mg.L<sup>-1</sup> de fenilalanina.

### 5.15 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO VANÍLICO, P-HIDROXIBENZALDEÍDO, VANILINA E ÁCIDO FERÚLICO

O ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico, extraídos de *V. planifolia* nos distintos tratamentos (item 4.17) foram identificados e quantificados por comparação dos tempos de retenção com os padrões e pela curva padrão dos compostos analisados (descritos no item 4.21). Os compostos detectados em quantidades abaixo da faixa de concentração da curva de calibração foram quantificados em relação a área do pico em %, correspondendo a 100% da área do pico aqueles com maior concentração encontrada para cada composto.

O tratamento CO (Tabela 24) apresentou resultados inferiores de concentrações dos compostos analisados em relação aos demais tratamentos.

Tabela 24. Teor do ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico obtido a partir de explantes *in vitro* de *V. planifolia* no tratamento CO\*.

Tempo (dias)	Área do pico (%)			
	Ácido Vanílico	p-hidroxibenzaldeído	Vanilina	Ácido Ferúlico
10	2.55	11.05	ND	15.41
20	ND	21.78	7.95	ND
30	ND	11.30	19.11	16.21

ND – Não detectado.

\*CO: meio MS suplementado com 1,0 mg.L<sup>-1</sup> de BAP e 0,5 mg.L<sup>-1</sup> de AIB, acrescido de 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 7 g.L<sup>-1</sup> de ágar.

O Tratamento CA (Tabela 25), resultou em uma porcentagem de área de 57,24 % de p-hidroxibenzaldeído aos 20 dias de cultivo e 25,40 % de área de vanilina aos 5 dias de cultivo.

Tabela 25. Teor do ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico obtido a partir de explantes *in vitro* de *V. planifolia* no tratamento CA\*.

Tempo (dias)	Área do pico (%)			
	Ácido Vanílico	p-hidroxibenzaldeído	Vanilina	Ácido Ferúlico
5	ND	30.07	25.40	9.26
10	ND	8.59	ND	0,73
20	ND	57.24	11.36	6.08
30	3.06	ND	ND	5.00

ND – Não detectado.

\*CA: meio MS suplementado com 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®, sem cisteína.

A adição de fenilalanina como precursor (Tabela 26) não aumentou a produção dos compostos extraídos ácido vanílico e p-hidroxibenzaldeído. A vanilina apresentou 32,12 % da área aos 10 dias de cultivo. Apenas o ácido ferúlico demonstrou um aumento da porcentagem de área (38,66%) aos 20 dias de cultivo com concentração equivalente a 35,2 mg.g<sup>-1</sup> de massa fresca (mf), que pode ser explicado pelo fato da fenilalanina ser o intermediário na biosíntese da maioria dos compostos fenólicos nas plantas, na rota do ácido chiquímico através da enzima fenilalanina amônia-liase (PAL) sendo esta enzima a responsável pela desaminação da L-fenilalanina, transformando-a em ácido trans-cinâmico e amônia, a partir deste momento o ácido trans-cinâmico pode ser incorporado em diferentes compostos fenólicos como o ácido 4-cumárico, ácido cafeico, ácido ferúlico e outros (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008; TAIZ & ZEIGER, 2006).

Tabela 26. Teor do ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico obtido a partir de explantes *in vitro* de *V. planifolia* no tratamento FE\*.

Tempo (dias)	Área do pico (%)			
	Ácido Vanílico	p-hidroxibenzaldeído	Vanilina	Ácido Ferúlico
5	2.17	10.47	29.63	4.49
10	2.60	35.70	32.12	6.30
20	9.16	19.15	13.18	38.66
30	ND	18.97	0.72	3,94

ND – Não detectado.

\*FE: meio MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® sem carvão ativado e com adição de 300 mg.L<sup>-1</sup> de fenilalanina.

A adição de fenilalanina influenciou no aumento de massa fresca, incremento de massa e porcentagem de massa seca, mas não aumentou a concentração dos fenóis totais, ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico quando comparado com os demais tratamentos.

Provavelmente isso se dá pela enzima PAL que é inibida por feedback (GOLLO *et al.*, 2016). E o restante da fenilalanina pode ter sido usado como fonte de nitrogênio orgânico, promovendo o maior crescimento de massa.

A adição de vitaminas Fuji (Tabela 27), como elicitador proporcionou um aumento na concentração de vanilina com apenas 5 dias de cultivo atingindo 15,4 mg.g<sup>-1</sup>mf (67,74 % da área do pico), também pode se observar aos 10 dias e 30 dias 29,86 e 43,29 %, respectivamente. Houve um aumento na porcentagem de área do composto p-hidroxibenzaldeído aos 5 dias de cultivo, atingindo 55,79 %.

Além disso, também se verificou um aumento significativo na concentração de fenóis totais e na produção de vanilina aos 5 dias de cultivo.

Tabela 27. Teor do ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico obtido a partir de explantes *in vitro* de *V. planifolia* no tratamento FU\*.

Tempo (dias)	Área do pico (%)			
	Ácido Vanílico	p-hidroxibenzaldeído	Vanilina	Ácido Ferúlico
5	10.62	55.79	67.74	8.79
10	1.53	20.63	29.86	5.95
20	0.94	5.16	6.10	3.38
30	0.70	ND	43.29	4.12

ND – Não detectado.

FU: meio MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® sem carvão ativado e com adição de 4 ml.L<sup>-1</sup> de vitaminas Fuji.

As vitaminas diminuíram o tempo de resposta da planta, diminuindo o tempo da rota de biossíntese da vanilina, pois a vanilina e o ácido p-hidroxibenzaldeído são os últimos componentes transformados nesta rota de interesse. As plantas em ambiente natural sintetizam a quantidade de vitaminas necessárias ao seu desenvolvimento, estando *in vitro* a planta pode sofrer carências de vitaminas limitando o seu crescimento. Sendo assim, o acréscimo de vitaminas pode colaborar com um aumento no crescimento, metabolismo e desenvolvimento da planta. O mio-inositol, componente das vitaminas Fuji, também é considerado um estimulador de crescimento e metabolismo, além de servir como fonte de carboidrato (TAIZ & ZEIGER, 2006; QUISEN & ANGELO, 2008).

A adição de vitaminas Fuji não apresentou um aumento significativo na multiplicação *in vitro* de *V. planifolia*, mas influenciou no aumento de massa fresca, incremento de massa e porcentagem de massa seca dos explantes tratados com estas vitaminas.

O ácido ferúlico adicionado como precursor (Tabela 28) induziu as maiores concentrações de ácido vanílico com concentração de 70,8 mg.g<sup>-1</sup>mf e p-hidroxibenzaldeído 8,3 mg.g<sup>-1</sup> mf (concentrações que correspondem a 100% da área do cromatograma do ácido vanílico e p-hidroxibenzaldeído respectivamente) aos 10 dias de cultivo. Estes compostos não são produzidos a partir do ácido ferúlico, embora sejam derivados da mesma via da fenilalanina, que através do ácido p-cumárico com a ação da enzima p-cumariol CoA, divide a via formando ácido ferúlico, e o restante da via forma ácido p-hidroxibenzoico que irá derivar na formação do ácido vanílico.

Tabela 28. Teor do ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico obtido a partir de explantes *in vitro* de *V. planifolia* no tratamento A\*.

Tempo (dias)	Área do pico (%)			
	Ácido Vanílico	p-hidroxibenzaldeído	Vanilina	Ácido Ferúlico
5	31.65	53.57	32.02	4,10
10	100	100	53.07	34.16
20	2,76	9.38	27.34	100
30	50.54	74.29	17.11	ND

ND – Não detectado.

\*A: meio MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel® sem carvão ativado e com adição de 300 mg.L<sup>-1</sup> de ácido ferúlico.

Este tratamento aos 10 dias obteve 10,4 mg.g<sup>-1</sup>mf de vanilina (53,07 % da área do cromatograma) e aos 20 dias obteve a concentração máxima de ácido ferúlico 113,6 mg.g<sup>-1</sup>mf, sendo que a planta assimilou 37% do precursor adicionado ao meio de cultivo e não sendo mais detectado na planta aos 30 dias. O ácido ferúlico em grande concentração pode produzir efeito tóxico na planta, pois foi observado que os explantes apresentavam oxidação, que também foi liberada no meio de cultivo, sugere-se a adição de uma concentração menor de ácido ferúlico como precursor.

A rota exata da biossíntese de ácido ferúlico em plantas não foi totalmente esclarecida, sabe-se que a partir da fenilalanina, o ácido cinâmico que foi catalizado pela enzima PAL, como anteriormente descrito, através de uma enzima que hidroxila o ácido cinâmico na posição 4 formando o ácido p-cumárico, este sofre hidrólise ácida, na posição 3, resultando no ácido cafeico, nesta etapa não se sabe se a participação de derivados da CoA ou hidroxilação por enzimas C3, a princípio o ácido ferúlico poderia ser metilado e assim formar o ácido ferúlico (GALLAGE & MØLLER, 2014). A via de biossíntese da vanilina nas vagens de *V. planifolia* segue uma rota similar até chegar a formação do ácido ferúlico que é sintetizado pela ação de uma única enzima a VpVAN, catalisando a conversão direta de ácido ferúlico e seu glicosídeo em vanilina e glicovanilina na sequência de uma reação retro-aldol (GALLAGE *et al.*, 2014).

A adição de ácido ferúlico não influenciou no aumento de massa fresca, incremento de massa e porcentagem de massa seca dos explantes. Mas demonstrou uma influência no aumento da concentração de fenóis totais aos 10 dias de cultivo, também pode ser observado um aumento das concentrações do ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído e vanilina, que correspondem aos 10 dias de cultivo em ambos os experimentos.

A adição de cisteína como elicitador (Tabela 29), aumentou concentração de vanilina em relação a todos os tratamentos, com produção de 26,4 mg.g<sup>-1</sup>mf (100 % da área do pico) aos 20 dias de cultivo. Em 10 dias de cultivo a concentração era de 14,5 mg.g<sup>-1</sup>mf e aos 30 dias, 17,6 mg.g<sup>-1</sup>mf de vanilina (64,99 e 74,10 % da área do pico, respectivamente).

Tabela 29. Teor do ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico obtido a partir de explantes *in vitro* de *V. planifolia* no tratamento T2\*.

Tempo (dias)	Área do pico (%)			
	Ácido Vanílico	p-hidroxibenzaldeído	Vanilina	Ácido Ferúlico
5	6.19	22.49	ND	18.20
10	ND	ND	64.99	21.80
20	10.57	25.70	100	26.01
30	5.42	22.04	74.10	18.45

ND – Não detectado.

\*T2: meio MS suplementado com 35 mg.L<sup>-1</sup> de cisteína, 2 g.L<sup>-1</sup> de carvão ativado, 2,15 mg.L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g.L<sup>-1</sup> de sacarose e solidificado com 2,2 g.L<sup>-1</sup> de Phytigel®.

Não consta na literatura, relatos de como a cisteína pode ter influenciado no aumento da produção de vanilina. Este fato deve ser melhor investigado, pois a cisteína é um aminoácido que participa do metabolismo primário em plantas e é utilizado em meios de cultivo para reduzir a oxidação nos tecidos (como já foi explicado anteriormente).

O excelente resultado desse tratamento também pode ter sido influenciado pela presença do carvão ativado, devido a sua função de retenção de substâncias que pode ter preservado os tecidos contra os compostos tóxicos, pois este tratamento havia apresentado melhores resultados na redução da ocorrência de oxidação. Vários estudos demonstram que o carvão ativado auxilia na redução e adsorção da oxidação dos compostos fenólicos (LININGTON, 1991; TEIXEIRA *et al.*, 1994; NGUYEN *et al.*, 2007).

Em nosso experimento, evitamos colocar carvão ativado juntamente com os elicitores e precursores, devido ao fato de que carvão ativado pudesse adsorver tais compostos, promovendo a diminuição da disponibilidade dessas substâncias para as plantas.

Como foi observado num híbrido de dendê (*Elais oleifera* x *Elais guineensis*) cultivado em meio MS acrescido de 0,3 % (p/v) de carvão ativado, foi utilizado o hormônio 2,4-D com concentração 50 vezes maior, para se obter o mesmo resultado de calogênese, comparando com o mesmo cultivo em meio MS sem o acréscimo do carvão ativado (TEIXEIRA *et al.*, 1993).

Mas supomos que sem a adição do carvão ativado, os compostos de interesse neste estudo podem até ser produzidos, mas acabaram oxidando. É possível que os precursores e elicitores adicionados com o carvão ativado



produziram resultados superiores aos que foram encontrados sem o carvão ativado.

Westcott *et al.* (1994), cultivaram raízes de *V. planifolia* em meio de cultivo MS com adição de carvão ativado e 500  $\mu\text{mol}$  de ácido ferúlico como precursor, e obtiveram uma concentração de 7100  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de massa seca após 15 dias de cultivo, trocando o carvão ativado a cada 3 dias. Os autores supõem em seu trabalho, que carvão ativado torna-se intimamente associado com os tecidos das raízes e provavelmente facilitou a transferência do precursor e produto para dentro e para fora do tecido, ultrapassando assim as etapas limitantes de velocidade na reação.

O tratamento T2 não mostrou melhor resultado no aumento da massa fresca, incremento de massa e porcentagem de massa seca dos explantes, mas influenciou no aumento da concentração de fenóis totais aos 20 dias de cultivo, que pode ser relacionado com o aumento da concentração de vanilina no mesmo tempo de cultivo. Mesmo não apresentando os melhores resultados em massa fresca e seca em relação aos demais tratamentos, foi obtida expressiva quantidade de vanilina, neste tratamento mesmo com menor massa.

Velankar & Heble (2004), cultivaram *in vitro* brotos de *V. planifolia*, em meio MS líquido suplementado com BAP (2  $\text{mg.l}^{-1}$ ) e ANA (2  $\text{mg.l}^{-1}$ ) para estudar os compostos aromáticos presentes na cultura de tecidos de *Vanilla* e encontraram os seguintes compostos: ácido vanílico com concentração de 2,28  $\mu\text{g.g}^{-1}$  de massa fresca (mf); 6,0  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{mf}$  de p-hidroxibenzaldeído; 0,32  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{mf}$  de vanilina; 2,75  $\mu\text{g.g}^{-1}\text{mf}$  de glicovanilina. O ácido ferúlico não foi detectado, durante os 20 dias de cultivo.

Rao & Ravishankar (2000a) relatam os principais compostos aromáticos presentes em maior concentração na vagem seca: vanilina 20  $\text{g.kg}^{-1}$  de vagem, ácido vanílico 1  $\text{g.kg}^{-1}$  de vagem, p-hidroxibenzaldeído 2  $\text{g.kg}^{-1}$  de vagem e ácido p- hidroxibenzoico 0,2  $\text{g.kg}^{-1}$  de vagem.

A maior concentração de vanilina encontrada em nossos resultados foi 26,4  $\text{mg.g}^{-1}\text{mf}$  e se aproxima da concentração encontrada na vagem de *V. planifolia*. Mesmo não produzindo muitas notas aromáticas próprias da vagem, o cultivo *in vitro* produz vanilina em um período curto de 20 dias.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho levaram às seguintes conclusões:

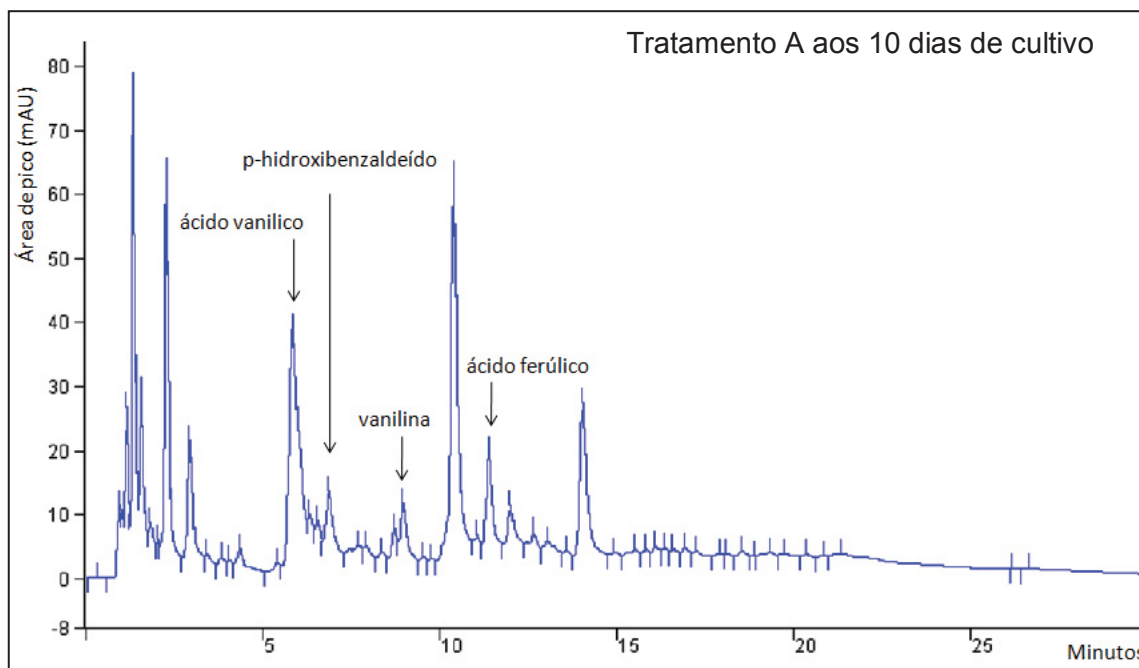
- *V. planifolia* apresenta problemas de oxidação de explantes e dificuldades de multiplicação.
- Meios líquidos não são bem tolerados, muitos explantes apresentaram hiperhidricidade.
- O isolamento de protuberância não foi eficiente para a multiplicação.
- Os hormônios vegetais BAP e ANA não foram eficientes na formação de calos, já os hormônios picloram e cinetina apresentaram formação de calos em pequena quantidade, mas não friáveis.
- A adição de antioxidantes e condições de cultivo não favorecem a inibição da oxidação.
- O meio de cultura MS com adição de cisteína e carvão ativado foi utilizado como meio basal e foi bastante eficiente na multiplicação *in vitro* de *V. planifolia*, na redução da oxidação dos explantes e na produção de vanilina.
- Os agentes solidificantes ágar e Phytigel não apresentaram influência significativa na multiplicação.
- A adição de vitaminas Fuji ao meio basal apresentou influências na multiplicação apenas aos 30 dias.
- Os substratos formulados possuem baixo custo e foram bem eficientes na aclimatização.
- A adição de fenilalanina e ácido ferúlico como precursores e vitaminas Fuji e cisteína como agente elicitores, apresentaram aumento na concentração de compostos fenólicos.
- Foram identificados e quantificados nos explantes *in vitro*, os compostos ácido vanílico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina e ácido ferúlico.
- A obtenção de vanilina a partir da indução *in vitro* é vantajosa, pois mesmo ocorrendo em pequena concentração é obtida em 20 dias de cultivo.

## 7 PERSPECTIVAS PARA PESQUISAS FUTURAS

- Estudar outros precursores e elicitores para aumentar a produção de vanilina;
- Estudar diferentes métodos de obtenção de calos friáveis de *V. planifolia*;
- Desenvolver meios de cultura para o cultivo em meio líquido de *V. planifolia* para evitar a ocorrência de hiperhidricidade;
- Verificar o potencial de produção de vanilina a partir de calos de *V. planifolia*;
- Verificar o potencial de produção de vanilina a partir de suspensão celular de *V. planifolia*;
- Verificar o potencial de produção de vanilina a partir de diferentes explantes de *V. planifolia*, tais como calos, células e brotações múltiplas em biorreatores;
- Transformar geneticamente explantes de *V. planifolia* para maximizar a produção de vanilina;
- Desenvolver um método eficiente de cura do extrato obtido dos explantes cultivados *in vitro*.

## 8 APÊNDICE

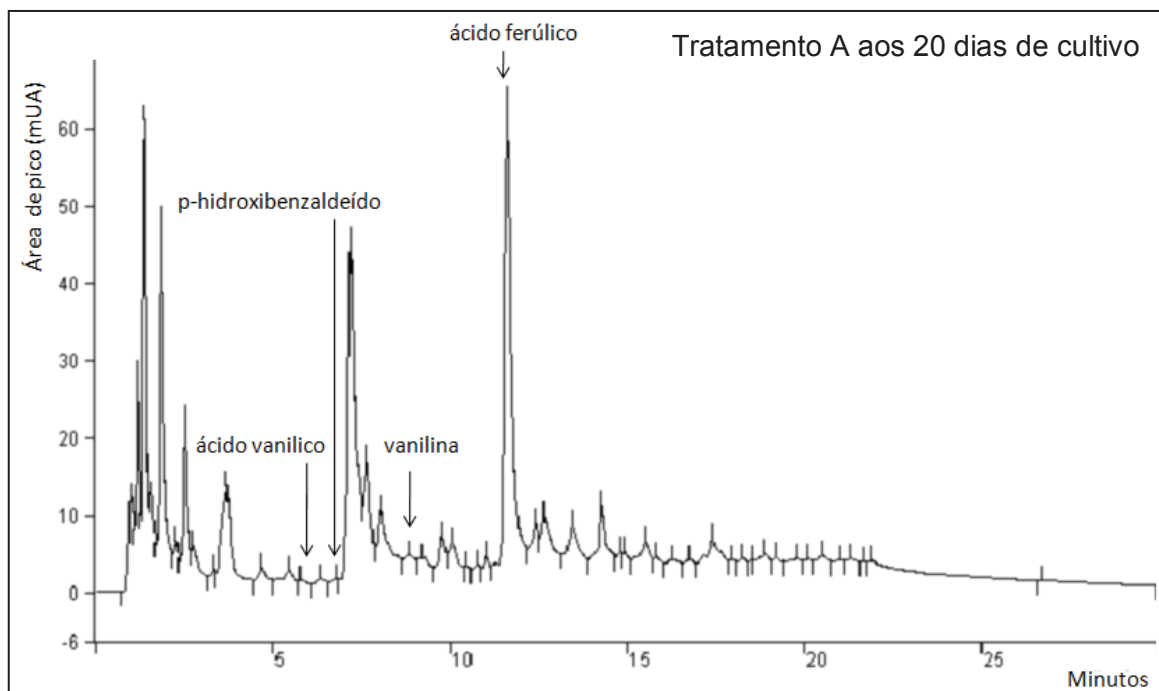
Cromatogramas:



Concentração máxima encontrada:

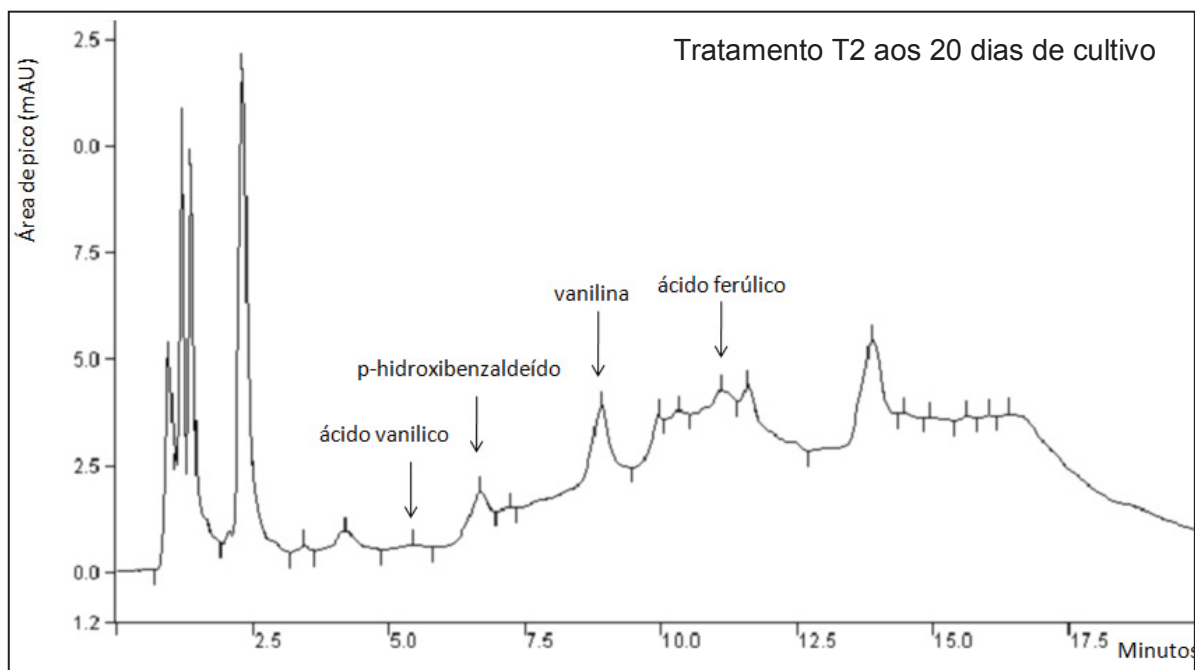
ácido vanílico- 70,8  $\text{mg.g}^{-1}\text{mf}$  (corresponde a 100% da área de pico)

p-hidroxibenzaldeído- 8,3  $\text{mg.g}^{-1}\text{mf}$  (corresponde a 100% da área de pico)



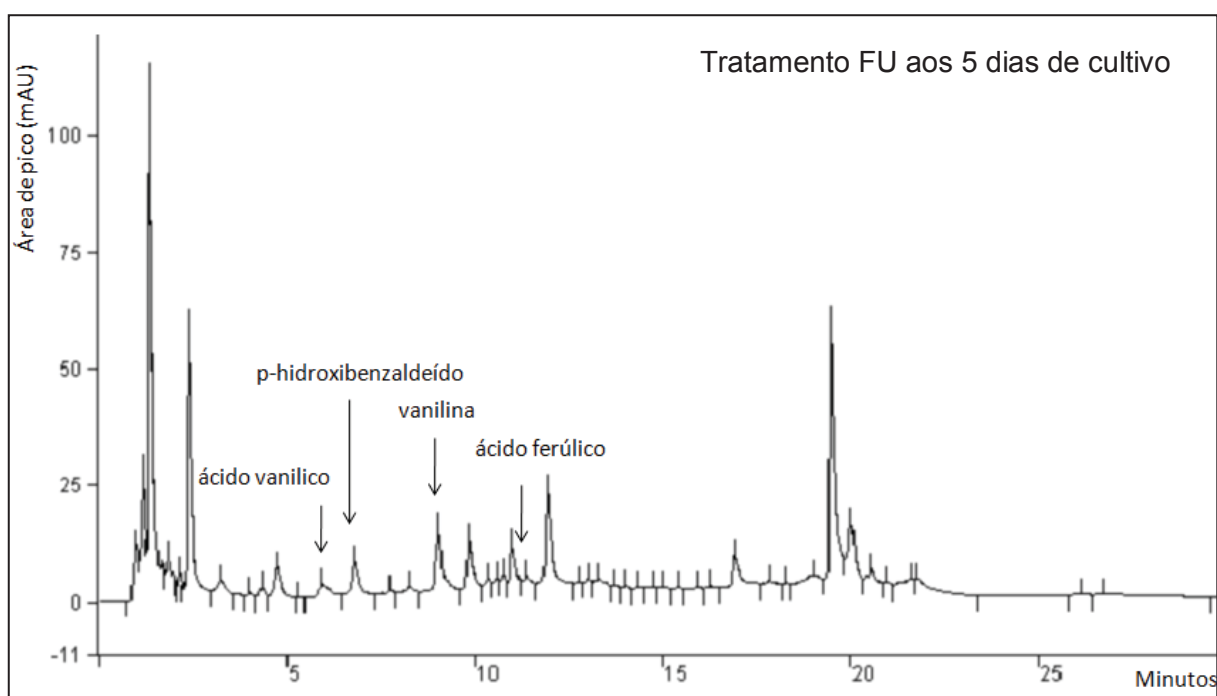
Concentração máxima encontrada:

ácido ferúlico- 113,6  $\text{mg.g}^{-1}\text{mf}$  (corresponde a 100% da área de pico)



Concentração máxima encontrada:

vanilina- 26,4 mg.g<sup>-1</sup>mf (corresponde a 100% da área de pico)



Concentração encontrada:

vanilina- 15,4 mg.g<sup>-1</sup>mf (corresponde a 67,74 % da área de pico)

## REFERÊNCIAS

- ABEBE, Z.; MENGESHA, A.; TERESSA, A.;TEFERA, W. Efficient *in vitro* multiplication protocol for *Vanilla planifolia* using nodal explants in Ethiopia. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, (24), p. 6817-6821, Dec. 2009.
- ABDELWAHD, R.; HAKAM, N.; LABHILILI, M.; UDUPA, S. M. Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. **African Journal of Biotechnology**. v. 7, (8), p. 997-1002, Apr. 2008.
- AINSCOUGH, E. W.; BRODIE, A.M. The Determination of Vanillin in Vanilla Extract An Analytical Chemistry Experiment. **Journal of Chemical Education**. V. 67, (12), Dec. 1990.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Flavors. Official methods of analysis Ed. Arlington, VA, v. 2, 15th, p. 891, 1995.
- ARDITTI, J.; ERNST, R. **Micropropagation of orchids**. John Wiley & Sons, New York. 1993.
- ARYA, D.; PATNI, V. Comparative analysis of total flavonoids and quercetin content *in vivo* and *in vitro* and enhancement of quercetin via precursor feeding in *Pluchea lanceolata* Oliver & Hiern. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**. v. 5, p. 617-621, 2013.
- AYYAPPAN, P. Vanilla - a money making venture for ambitious farmers. **Kisan World**. 7, p. 24-26, 1990.
- BALDOTTO, L. E. B.; BALDOTTO, M. A.; GIRO, V. B.; CANELLAS, L. P.; OLIVERAS, F. L.; BRESSAN-SMITH, R. Desempenho do abacaxizeiro 'Vitória' em resposta à aplicação de ácidos húmicos durante a aclimação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v.33, n.4, p. 979-990, 2009.

BELAY, M. T.; POOLE, C. F. Determination of Vanillin and Related Flavor Compounds in Natural Vanilla Extracts and Vanilla-Flavored Foods by Thin Layer Chromatography and Automated Multiple Development. **Chromatographia**. v. 37, (7/80), Oct. 1993.

BERGER, R. G. **Aroma Biotechnology**. Springer: Berlin, Heidelberg, New York, 2000.

BETTAZZI, F.; PALCHETTI, I.; SISALLI, S.; MASCINI, M. A disposable electrochemical sensor for vanillin detection. **Analytica Chimica Acta**. 555, p. 134–138, 2006.

BLAINSKI, A.; LOPES, G. C.; MELLO, J. C. P. Application and Analysis of the Folin Ciocalteu Method for the Determination of the Total Phenolic Content from *Limonium Brasiliense* L. **Molecules** 18, p. 6852-6865, 2013.

BORY, S.; GRISONI, M.; DUVAL, M.; BESSE, P. Biodiversity and preservation of vanilla: present state of knowledge. **Genetic Resources and Crop Evolution**. 55, p. 551–571, 2008.

BOYCE, M. C.; HADDAD, R. P.; SOSTARIC, T. Determination of flavour components in natural vanilla extracts and synthetic flavourings by mixed micellar electrokinetic capillary chromatography. **Analytica Chimica Acta**. 485, p. 179–186, 2003.

BRASIL. Secretaria de Comércio Exterior. Alice web2. Brasília, DF, 2014. Disponível em: <<http://aliceweb.mdic.gov.br//consulta-ncm/index/type/importacaoNcm>>. Acesso em: 16 julho, 2015.

CARVALHO, M. A. D. F.; PAIVA, R.; STEIN, V. C.; HERRERA, R.C.; PORTO, J. M. P.; VARGAS, D. P.; ALVES, E. Induction and morpho-ultrastructural analysis of organogenic calli of a wild passionfruit. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 57, p. 851-859, 2014.

CARVALHO, M. A. F.; PAIVA, R.; HERRERA, R. C.; ALVES, E.; CASTRO, E. M.; PAIVA, P. D. O.; VARGAS, D. P. Indução, análises morfológicas e ultraestruturais de calos de maracujazeiro nativo. **Revista Ceres**. v. 62, (4), p. 340-346, jul-ago. 2015.

CID, L. P. B.; TEIXEIRA, J. B. Oxidação fenólica, vitrificação e variação somaclonal. In: CID, L. P. B. (Eds.), **Cultivo *in vitro* de plantas**. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, p. 51- 66, 2010.

CHAIM, J. R. Y. B.; MONTE BELLO, C. C.; DORNELAS, M.C. Species dependent divergent responses to *in vitro* somatic embryo induction in *Passiflora* spp. **Plant Cell Tissue and Organ Culture**. 120, p. 69-77, 2015.

COSTA, J. L.; SILVA, A. L. L.; BIER M. C. J.; BRONDANI, G. E.; GOLLO, A. L.; LETTI, L. A. J.; ERASMO, E. A. L.; SOCCOL, C. R. Callus Growth Kinetics of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.) and Content of Fatty Acids from Crude Oil Obtained In Vitro. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 176, p. 892–902, 2015.

CRUZ, C. D. **Programa Genes: versão Windows; aplicativo computacional em genética e estatística**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária. p. 648, 2001.

DAUGSCH, A.; PASTORE, G. Production of vanillin: a biotechnological opportunity. **Química Nova**. v. 28, (4), July/Aug. 2005.

DAVIDONIS, G.; KNORR, D. Callus formation and shoot regeneration in *Vanilla planifolia*. **Food Biotechnology**. 5, p. 59–66, 1991.

DEBERGH, P. Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium. **Physiologia Plantarum**. 59, p. 270-276, 1983.

DEBERGH, P.C.; ZIMMERMAN, R.H. **Micropropagation: Technology and Application**. London: Kluwer Academic Publishers, p. 484, 1991.



DIAZ, M. S.; LORENA, P.; ANA, C. F.; MARTA, E. G. *In Vitro* Propagation of Muña-Muña (*Clinopodium odorum* (Griseb.) Harley). **Biotechnology Research International**, v. 2, p. 1-6, 2012.

DIGNUM, M. J. W.; KERLER, J.; VERPOORTE, R. Vanilla production: technological, chemical, and biosynthetic aspects. **Food Reviews International**. 17, p. 199–219, 2001.

DIGNUM, M. J. W.; KERLER, J.; VERPOORTE, R. Vanilla curing under laboratory conditions. **Food Chemistry**. 79, p. 165–171, 2002.

DIVAKARAN, M.; BABU, N. Micropropagation and In Vitro Conservation of Vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews). In: JAIN, S. M.; SAXENA, P. K. (Eds.), **Methods in Molecular Biology, Protocols for In Vitro Cultures and Secondary Metabolite Analysis of Aromatic and Medicinal Plants**. v. 547, 2009.

DIXON, R. A.; ACHNINE, L.; KOTA, P.; LIU, C. J.; REDDY, M.S.S.; WANG, L. The phenylpropanoid pathway and plant defense e a genomics perspective. **Molecular Plant Pathology** 3, p. 371-390, 2002.

DIXON, R. A. Vanillin biosynthesis e not as simple as it seems. In: HAVKINFRENKEL, D., BELANGER, F.C. (Eds.), **Handbook of Vanilla Science and Technology**. 5 edition. Blackwell Publishing Ltd, New York, p. 292- 298, 2011.

DONG, Z.; GU, F.; XU, F.; WANG, Q. Comparison of four kinds of extraction techniques and kinetics of microwave-assisted extraction of vanillin from *Vanilla planifolia* Andrews. **Food Chemistry**. 149, p. 54–61, 2014.

EHLERS, D. HPLC-untersuchung von handelsproducten mit vanille oder vanilla aroma. **Deutsche Lebens. Rund**. 95, p. 464–468, 1999.

FACHINELLO, J. C.; HOFFMANN, A.; NACHTIGAL, J. C. **Propagação de plantas frutíferas**. Embrapa Informações Tecnológicas, Brasília, DF, p. 221, 2005.

FAO. FAOSTAT. Food and agriculture organization of the united nations. Statistics Division. 2012. Disponível em: <<http://faostat3.fao.org/download/P/PI/E>>. Acesso em: 15 julho, 2015.

FOCK-BASTIDE, I.; PALAMA, T. L.; BORY, S.; LÉCOLIER, A.; NOIROT, M.; JOËT, T.

Expression profiles of key phenylpropanoid genes during *Vanilla planifolia* pod development reveal a positive correlation between PAL gene expression and vanillin biosynthesis. **Plant Physiology and Biochemistry**. 74, p. 304-314, 2014.

FUNK, C.; BRODELIUS, P. E. Influence of growth regulators and an elicitor on phenylpropanoid metabolism in suspension cultures of *Vanilla planifolia*. **Phytochemistry**. 29, p. 845–848, 1990.

FUNK, C.; BRODELIUS, P. E. *Vanilla planifolia* Andrews: *In vitro* biosynthesis of vanillin and other phenylpropanoid derivatives. In: **Biotechnology in Agriculture and Forestry**, vol. 26. Medicinal and Aromatic Plants VI (Bajaj, Y. P. S., ed.). Springer-Verlag, Berlin. p. 377-402, 1994.

GALLAGE, N. J.; HANSEN, E. H.; KANNANGARA, R.; OLSEN, C. E.; MOTAWIA, M. S.; JORGENSEN, K.; HOLME, I.; HEBELSTRUP, K.; GRISONI, M.; MØLLER, B. L. Vanillin formation from ferulic acid in *Vanilla planifolia* is catalysed by a single enzyme. **Nature Communications** 5:4037 , DOI: 10.1038/ncomms5037, 2014.

GALLAGE, N. J.; MØLLER, B. L. Vanillin – Bioconversion and Bioengineering of the most popular plant flavour and its de novo biosynthesis in the vanilla orchid. **Molecular Plant**. September 30, 2014.

GANESH, D.S.; SREENATH, H. L.; JAYASHREE, G. Micropropagation of vanilla through node culture. **Journal of Plantation Crops**. 24, p. 16–22, 1996.

GEETHA, S.; SHETTY, S. A. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*, a tropical orchid. *Current Science*. 79, p. 886–889, 2000.

GEORGE, E. F. **Plant Propagation by Tissue Culture**. The Technology. 2 edition. England. v. 1. p. 650, 1996.

GEORGE, P. S.; RAVISHANKAR, G. A. *In vitro* multiplication of *Vanilla planifolia* using axillary bud explants. **Plant Cell Reports**. 16, p. 490-494, 1997.

GIRIDHAR, P.; OBUL REDDY, B.; RAVISHANKAR, G. A. Silver nitrate influences *in vitro* shoot multiplication and root formation in *Vanilla planifolia* Andr. **Current Science**. v. 81, (9), nov. 2001.

GIRIDHAR, P.; RAVISHANKAR, G. A. Efficient micropropagation of *Vanilla planifolia* Andr. under the influence of thidiazuron, zeatin and coconut milk. **Indian Journal Biotechnology**. 3, p. 113–118, 2004.

GOLLO, A. L.; SILVA, A. L. L.; LIMA, K. K. D.; COSTA, J. L.; CAMARA, M. C.; BIASI, L. A.; RODRIGUES, C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, V. T.; SOCCOL, C. R. Developing a plant culture medium composed of vinasse originating from *Haematococcus pluvialis* culture. **Pakistan Journal of Botany**. v. 48, n. 1, p. 295-303, 2016.

GONZALEZ-ARNAO, M. T.; LAZARO-VALLEJO, C. E., ENGELMANN, F.; GAMEZ-PASTRANA, R.; MARTINEZ-OCAMPO, Y. M.; PASTELIN-SOLANO, M. C.; DIAZ-RAMOS, C. Multiplication and cryopreservation of vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews') **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 45, p. 574–582, 2009.

GOPI, C.; VATSALA, T.M.; PONMURUGAN, P. *In vitro* Multiple Shoot Proliferation and Plant Regeneration of *Vanilla planifolia* Andr. - A Commercial Spicy Orchid. **Journal Plant Biotechnology**. v. 8, (1), p. 37-41, 2006.

GRANDO, M. F.; EICHLER, L. TANABE, C. R.; SANTOS, J. F.; SANTOS, C. M. Indução de calos e regeneração de plantas em três genótipos de aveia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. v. 5, (2), p. 139-144, 1993.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A.. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S. **Técnicas e aplicações da cultura de tecidos de plantas**. Brasília: ABCTP/Embrapa CNPH, p. 99-169, 1998.

GU, Z.; ARDITTI, J.; NYMAN, L. P. *Vanilla planifolia*: Callus induction and plantlet production *in vitro*. **Lindleyana**. 2, p. 48–52, 1987.

HARTMAN, T. G.; KARMAS, K.; CHEN, J.; SHEVADE, A.; DEAGRO, M.; HWANG, H. Determination of vanillin, other phenolic compounds, and flavors in vanilla beans. Direct thermal desorption - gas chromatography and – gas chromatography -mass spectrometric analysis. In: HO, C.; LEE, C. Y.; HUANG, M. (Eds.), **Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I**. Analysis, occurrence and chemistry. ACS Symposium Series. Washington, DC: American Chemical Society. v. 506, p. 60–76, 1992.

HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F. **Handbook of Vanilla Science and Technology**. Wiley-Blackwell. 2010.

HOMMA, A. K. O.; MENEZES, A. J. E. A. Cultivo de baunilha: uma alternativa para agricultura familiar na Amazônia. In: HOMMA, A. K. O. **Extrativismo vegetal na Amazônia**. EMBRAPA. Brasília, DF, p. 468, 2014.

JADHAV, D.; REKHA, B. N.; GOGATE, P. R.; RATHOD, V. K. Extraction of vanillin from vanilla pods: A comparison study of conventional Soxhlet and ultrasound assisted extraction. **Journal of Food Engineering**. 93, p. 421–426, 2009.

JAGERDEO, E.; PASSETTI, E.; DUGAR, S. M. Liquid chromatographic determination of vanillin and related aromatic compounds. **Journal of AOAC International**. 83, p. 237–240, 2000.

JANARTHANAM, B.; SESHADRI, S. Plantlet regeneration from leaf derived callus of *Vanilla planifolia* Andr. **In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**. 44, p. 84-89, 2008.

KAÇAR, Y. A.; BICEN, B.; VAROL, Í.; MENDI, Y. Y.; SERÇE, C.; ÇETINER, S. Gelling agents and culture vessels affect *in vitro* multiplication of banana plantlets. **Genetics and Molecular Research**. 9, (1), p. 416-424, 2010.

KALIMUTHU, K.; SENTHILKUMAR, R. ; MURUGALATHA, N. Regeneration and mass multiplication of *Vanilla planifolia* Andr. - a tropical orchid. **Current Science**. 91, p. 1401-1403, 2006.

KNUTH, M.E.; SAHAI, O. P. Flavour composition and method. United States Patent No. 5,068, 184, 1991.

KONONOWICZ, H.; JANICK, J. *In vitro* propagation of *Vanilla planifolia*. **HortScience**. 19, p. 58–59, 1984.

LAINÉ, E.; DAVID, A. Regeneration of plants from leaf explants of micropropagated clonal *Eucalyptus grandis*. **Plant Cell Reports**. 13, p. 473-476, 1994.

LAMEIRA, O. A. **Propagação *in vivo* e *in vitro*, dinâmica de crescimento de células, nutrição e identificação de flavonóides em erva-baleeira (*Cordia verbenacea* L.)**. Tese. Doutorado em Fitotecnia – Universidade Federal de Lavras, MG. p. 88, 1997.

LAMPRECHT, G.; PICHLMAYER, F.; SCHMID, E. R. Determination of the authenticity of vanilla extracts by stable isotope ration analysis and component

analysis by HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 42, p. 1722–1727, 1994.

LEE-ESPINOSA, H. E.; MURGUÍA-GONZÁLEZ, J.; GARCÍA-ROSAS, B.; CÓRDOVA-CONTRERAS, A. L.; LAGUNA-CERDA, A.; MIJANGOS-CORTÉS, J. O.; BARAHONA-PÉREZ, L. F.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; SANTANA-BUZZY, N. *In Vitro* Clonal Propagation of Vanilla (*Vanilla planifolia* 'Andrews'). **HortScience**. 43, (2), p. 454–458, 2008.

LININGTON, I.M. *In vitro* propagation of *Dipterocarpus alatus* and *Dipterocarpus intricatus*. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** 27:81–8, 1991.

LONGARES-PATRÓN, A.; CAÑIZARES-MACÍAS, M. P. Focused microwaves-assisted extraction and simultaneous spectrophotometric determination of vanillin and p-hydroxybenzaldehyde from *Vanilla fragans*. **Talanta**, 69, p. 882–887, 2006.

LONGO, M. A.; SANROMAN, M. A. Production of food aroma compounds: microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology and Biotechnology**. 44, (3), p. 335–353, 2006.

LUQUE-GARCÍA, J. L.; CASTRO, M. D. L. Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: devices and applications. **Talanta**. 64, p. 571–577, 2004.

MABBERLEY, D.J. **The plant-book**. University Press, Cambridge, UK. 2 edition, p. 858-870, 1997.

MARKS, T.R.; SIMPSON, S.E. Reduced phenolic oxidation at culture initiation in vitro following the exposure of field-grown stockplants to darkness or low levels of irradiance. **Journal of Horticultural Science**. Ashford. v. 65, (2), p. 103-111, Jan. 1990.

MEDINA, J. C.; JIMÉNES, G. C. R.; GARCÍA, H. S.; ZARRABAL, T. L. R.; ALVARADO, M. A. G.; OLVERA, V. J. R. **Vanilla: Post-harvest Operations**. FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. p. 50, 2009.

MINOO, D. **Seedling and somaclonal variation and their characterization in Vanilla**. Ph.D Thesis. Calicut University, Kerala, India. 2002.

MØLLER, I. M.; JENSEN, P. E.; HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 58, p. 459-481, 2007.

MURASHIGE T.; SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiology Plantarum**. 15, p. 473–497, 1962.

NAIRN, B.J., FURNEAUX, R.H. & STEVENSON, T.T. Identification of an agar constituent responsible for hydric control in micropropagation of radiata pine. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 43, p. 1-11, 1995.

NEGISHI, O.; OZAWA, T. Determination of hydroxycinnamic acids, hydroxybenzoic acids, hydroxybenzaldehydes, hydroxybenzyl alcohols and their glucosides by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**. 756, p. 129–136, 1996.

NEŠTÁKOVÁ, M.; HAVRLENTOVÁ, M. FARAGÓ, J. Effect of gelling agents on *in vitro* multiplication of two ornamental plants. **Biologia** 55, p. 409-411, 2000.

NGUYEN, K.; BARTON, P.; SPENCER, J. S. Supercritical carbon dioxide extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**. 4, p. 40-46, 1991.

NGUYEN, T.V.; THU, T.T.; CLAEYS, M.; ANGENON, G. Agrobacterium mediated transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using an improved in vitro regeneration system. **Plant Cell Tissue Organ Culture**. 91:155–64, 2007.

OVERHAGE, J.; PRIEFERT, H.; STEINBUCHER, A. Biochemical and genetic analyses of ferulic acid catabolism in *Pseudomonas* sp. Strain HR199. **Applied Environmental Microbiology**. 65, p. 4837–4847, 1999.

PAK, F.E.; GROPPER, S.; DAI, W.D.; HAVKIN-FRENKEL, D.; BELANGER, F.C. Characterization of a multifunctional methyltransferase from the orchid *Vanilla planifolia*. **Plant Cell Reports**. 22, p. 959- 966, 2004.

PERES, L. E. P. Bases fisiológicas e genéticas da regeneração de plantas in vitro. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n. 25, 2002.

PÉREZ-SILVA, A.; ODOUX, E.; BRAT, P.; RIBEYRE, F.; RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, G.; ROBLES-OLVERA, V. GC-MS and GC-olfactometry analysis of aroma compounds in a representative organic aroma extract from cured vanilla (*Vanilla planifolia* G. Jackson) beans. **Food Chemistry**. 99, (4), p. 728–735, 2006.

PHILIP, V.J.; NAINAR, A. Z. Clonal propagation of *Vanilla planifolia* (Salisb.) Ames using tissue culture. **Journal of Plant Physiology**. 122, p. 211–215, 1986.

PODSTOLSKI, A.; HAVKIN-FRENKEL, D.; MALINOWSKI, J.; BLOUNT, J. W.; KOURTEVA, G.; DIXON, R. A. Unusual 4-hydroxybenzaldehyde synthase activity from tissue cultures of the vanilla orchid *Vanilla planifolia*. **Phytochemistry**. 61, p. 611–620, 2002.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de Procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Embrapa Amazônia Ocidental. p. 44, 2008.

RAMOS-CASTELLÁ, A.; IGLESIAS-ANDREU, L. G.; BELLO-BELLO, J.; LEE-ESPINOSA, H. Improved propagation of vanilla (*Vanilla planifolia* Jacks. Ex Andrews) using a temporary immersion system. **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**. v. 50, (50), p. 576-581, Oct. 2014.



RANADIVE, A. S. Vanilla-Cultivation, curing, chemistry, technology and commercial products. Developments in Food Science. In: CHARALAMBOUS, G. **Spices, Herbs and Edible fungi**. Elsevier Science B.V., Amsterdam. v. 34, p. 517-576, 1994.

RAO, Y. S.; MATHEW, M. K.; MADHUSOODANAN, K. J.; NAIDU, R. Multiple shoot regeneration in Vanilla (*V. planifolia* Andrews). **Journal of Plantation Crops**. 21, p. 351-354. 1993.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Biotransformation of isoeugenol to vanilla flavour metabolites and capsaicin in suspended and immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*: study of the influence of  $\beta$ -cyclodextrin and fungal elicitor. **Process Biochemistry**. v. 35, p. 341–348, 1999.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Vanilla cultivation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 80, p. 1-16, 2000a.

RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Vanilla flavor: production by conventional and biotechnological routes. **Journal of Agricultural Science**. v. 80, p. 289-304, 2000b.

RENUGA, G.; KUMAR S. N. S. Induction of vanillin related compounds from nodal explants of *Vanilla planifolia* using BAP and Kinetin. **Asian Journal of Plant Science and Research**, 4, (1), p. 53-61, 2014.

ROMAGNOLI, L. G.; KNORR, D. Effects of ferulic acid treatment on growth and flavour development of cultured *Vanilla planifolia* cells. **Food Biotechnology**. 2, p. 93–104, 1988.

SCHARRER, A.; MOSANDI, A. Reinvestigation of vanillin contents and component rations of vanilla extracts using high-performance liquid chromatography and gas chromatography. **Deutsche Lebensmittel – Rundschau**. 97, p. 449–456, 2001.

SCHEIDT, G. N.; SILVA, A. L. L.; OLIVEIRA, Y.; COSTA, J. L.; BIASI, L. A.; C.R. SOCCOL. *In vitro* growth of *Melaleuca alternifolia* Cheel in bioreactor of immersion by bubbles. **Pakistan Journal of Botany**. v. 43, n. 6, p. 2937-2939, 2011.

SCHOLTEN, H. J.; PIERIK, R. L. M. Agar as a gelling agent: Differential biological effects *in vitro*. **Scientia Horticulturae**. 77, p. 1-2, August. 1998.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular**. Piracicaba: FEALQ, p. 227-248, 2008.

SHARMA, A.; VERMA, S. C.; SAXENA, N.; CHADDA, N.; SINGH, N. P.; SINHA, A. K. Microwave and ultrasound assisted extraction of vanillin and its quantification by high performance liquid chromatography in vanilla planifolia. **Journal of Separation Science**. 29, p. 613–619, 2006.

SILVA, A. L. L., DORNELLES, E. B.; BISOGNIN, D. A.; FRANCO, E. T. H.; HORBACH, M. A. Micropropagation of *Dyckia agudensis* Irgang & Sobral – an extinction threatened bromeliad. **IHERINGIA Série Botânica**. v. 62, n. 1-2, p. 39-43, jan./dez. 2007.

SILVA, A. L. L.; FRANCO, E. T. H.; DORNELLES, E. B.; GESING, J. P. A. Micropropagação de *Dyckia maritima* Baker – Bromeliaceae. **IHERINGIA Série Botânica**. Porto Alegre, v. 63, (1), p.135-138, jan./jun. 2008.

SILVA, A. L. L.; BISOGNIN, D. A.; FRANCO, E. T. H.; HORBACH, M. A.; COSTA, J. L.; SCHEIDT, G. N.; ALVES, S. A. O.; BRONDANI, G. E. Germinação *in vitro* de sementes e indução de calos em plântulas, cotilédones e anteras de porongo (*Lagenaria siceraria* (Mol. Stand.) – Cucurbitaceae. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4, p. 117-126, 2012.

SILVA, A. L. L.; COSTA, J. L.; GOLLO, A. L.; SANTOS, J.D.; FORNECK, H. R.; BIASI, L. A.; SOCCOL, V. T.; CARVALHO, J. C.; SOCCOL, C. R. Development of a vinasse culture medium for plant tissue culture. **Pakistan Journal of Botany**. 46, (6), p. 2195-2202, 2014.

SILVA, A. L. L.; GOLLO, A. L.; BRONDANI, G. E.; HORBACH, M. A.; OLIVEIRA, L. S.; MACHADO, M. P.; LIMA, K. K. D.; COSTA, J. L. Micropropagation of *Eucalyptus saligna* Sm. from cotyledonary nodes. **Pakistan Journal of Botany**. v. 47, n. 1, p. 311-318, 2015.

SINGLETON, V. L.; ROSSI Jr, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**. 16, p. 144-158, 1965.

SINHA, A. K.; SHARMA, U. K.; SHAR, N. A comprehensive review on vanilla flavor: Extraction, isolation and quantification of vanillin and others constituents International **Journal of Food Sciences and Nutrition**. 59, (4), p. 299-326, Jun. 2008.

SMITH, R. H. **Plant tissue culture: techniques and experiments**. San Diego: academic. p. 171, 1992.

SOSTARIC, T.; BOYCE, M. C.; SPICKETT, E. E. Analysis of the volatile compounds in vanilla extracts and flavorings by solid-phase microextraction and gas chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**. 48, p. 5802–5807, 2000.

SREEDHAR. R. V.; VENKATACHALAM, L.; NEELWARNE, B. Hyperhydricity-Related Morphologic and Biochemical Changes in Vanilla (*Vanilla planifolia*). **Journal Plant Growth Regulation**. 28, p. 46–57, 2009.

SUDHAKAR, J. T.; RAVISHANKAR, G. A.; VENKATARAMAN, L. V.; Biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin

in immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. **Plant Cell Tissue Culture**. 44, p. 117-121, 1996.

SUJALMI, S.; SUHARSO, S.; SUPRIYANTO, R.; BUCHARI, B. Determination of vanillin in vanilla (*Vanilla planifolia* Andrews) from Lampung Indonesia by high performance liquid chromatography. **Indian Journal of Chemistry**. 5, (1), p. 7 – 10, 2005.

TAIZ, L. ; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed. p. 722, 2006.

TAN, B. C.; CHIN, C. F.; ALDERSON, P. Optimisation of plantlet regeneration from leaf and nodal derived callus of *Vanilla planifolia* Andrews. **Plant Cell Tissue and Organ culture**. Org. Cult.\_ 105, (3), p. 457-463. , Jun. 2010.

TAN, B. C.; CHIN, C. F.; ALDERSON, P. An Improved Plant Regeneration of *Vanilla planifolia* Andrews. **Plant Tissue Culture & Biotechnology**. 21, (1), p. 27-33, Jun. 2011.

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of oil palm. **Plant Cell Tissue and organ Culture**. 34, p. 227-233, 1993.

TEIXEIRA, J. B.; SONDAHL, M. R.; KIRBY, E. G. Somatic embryogenesis from immature inflorescences of oil palm. **Plant Cell Reports**. 13:247–50, 1994.

THOMAS, T. D. The role of activated charcoal in plant tissue culture. **Biotechnology Advances**. v. 26, p. 618-631, 2008.

TOURNIER, V.; GRAT, S.; MARQUE, C.; KAYAL, W.; PENCHEL, R.; ANDRADE, G.; BOUDET, A.M.; TEULIÈRES, C. An Efficient Procedure to Stably Introduce Genes into an Economically Important Pulp Tree (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*). **Transgenic Research**. v. 12, (4), p. 403-411, 2003.

UTINO, S.; CARNEIRO, I. F.; CHAVES, L. J. Crescimento e oxidação de explantes de bananeira-prata (*musa aab*) *in vitro*. i. oncentrações de sais de ferro, cobre e zinco. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 23, (2), p. 225-229, Ag. 2001.

VALDEZ-FLORES, C; CAÑIZARES-MACIAS, M. P. On-line dilution and detection of vainillin in vanilla extracts obtained by ultrasound. **Food Chemistry**. 105, p. 1201–1208, 2007.

VEGA, G. R.; CERVANTES, S. M. A.; ALVARADO, M. A. G.; ROMERO-MARTÍNEZ, A.; HEGEL, P. E. Fractionation of vanilla oleoresin by supercritical CO<sub>2</sub> technology. **The Journal of Supercritical Fluids**. 108, p. 79-88, 2016.

VELANKAR, M. H.; HEBLE, M. R. Biotransformation of Externally Added Vanillin Related Compounds by Multiple Shoot Cultures of *Vanilla planifolia*. **Journal Plant Biochemistry & Biotechnology**. v. 13, p. 153-156, Jul. 2004.

VOISINE, R., CARMICHAEL, L., CHALIER, P., CORMIER, F., & MORIN, A. Determination of glucovanillin and vanillin in cured vanilla pods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 43, p. 2658–2661, 1995.

WALISZEWSKI, K. N.; PARDIO, V. T.; OVANDO, S. A simple and rapid HPLC technique for vanillin determination in alcohol extract. **Food Chemistry**. 101, p. 1059–1062, 2006.

WALTON, N. J.; MAYER, M. J.; NARBAD, A. Vanillin. **Phytochemistry** . 63, p. 505-515, 2003.

WESTCOTT, R. J.; CHEETHAM, P. S. J.; BARRACLOUGH, A. J. Use of organized viable vanilla plant aerial roots for the production of natural vanillin. **Phytochemistry**. 35, n. 1, p. 135-138, 1994.

ZANDONADI, D. B.; CANELLAS, L. P.; FAÇANHA, A. R. Indolacetic and humic acids induce lateral root development through a concerted plasmalemma and tonoplast H<sup>+</sup> pumps activation. **Planta**, v. 225, n. 6, p. 1583-1595, 2007.

ZURADA, A. B.; IZZATI, K. H. F. L.; NAZREENA, O. Y.; ZALIHA, W. S. W.; RADZIAH, C. M. Z. C.; ZAMRI, Z.; SREERAMA, S. A Simple and Efficient Protocol for the Mass Propagation of *Vanilla planifolia*. **American Journal of Plant Sciences**. 4, p.1685-1692, 2013.